

FABIOLA DA SILVA NARDI

**VARIABILIDADE GENÉTICA DOS EXONS 2, 3 E 4 DO GENE *HLA-G*,
NÍVEL SÉRICO DE sHLA-G E SUA INFLUÊNCIA NA FALHA DE
IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA.**

CURITIBA
2012

FABIOLA DA SILVA NARDI

**VARIABILIDADE GENÉTICA DOS EXONS 2, 3 E 4 DO GENE *HLA-G*,
NÍVEL SÉRICO DE sHLA-G E SUA INFLUÊNCIA NA FALHA DE
IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Genética, do Curso de
Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^a. Dr^a Maria da Graça Bicalho

Co-Orientador: Dr^a. Pryscilla Fanini Wowk

CURITIBA
2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Nardi, Fabiola da Silva

Variabilidade genética dos exons 2, 3 e 4 do gene *HLA-G*, nível sérico de sHLA-G e sua influência na falha de implantação embrionária. / Fabiola da Silva Nardi. – Curitiba, 2012.

63 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria da Graça Bicalho

Co-orientadora: Priscilla Fanini Wowk

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Antígenos de histocompatibilidade HLA 2. Implantação do embrião I. Título II. Bicalho, Maria da Graça III. Wowk, Priscilla Fanini IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed) 616.0792

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **FABÍOLA DA SILVA NARDI**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 1º de fevereiro de 2012

B. J. Bicalho

Professor Jorge Milton Neumann

Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre/RS – Membro Titular

Alexandra Senegaglia

Professora Doutora Alexandra Senegaglia

Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Membro Titular

Iglenir João Cavalli

Professor Doutor Iglenir João Cavalli

Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

Karin Braun-Prado

Professora Doutora Karin Braun-Prado

Dep. Patologia Básica/UFPR – Membro Titular

Priscilla Fanini Wowk

Doutora Priscilla Fanini Wowk

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade/UFPR – Membro Titular

M. da Graça Bicalho

Professora Doutora Maria da Graça Bicalho

Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Visto

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



“É preciso ser um realista para
descobrir a realidade.
É preciso ser um romântico
para criá-la.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à Prof.^a Dr^a Maria da Graça Bicalho por sua orientação, empatia e disposição durante a realização deste projeto.

Aos Drs. Jorge Milton Neumann e Tatiana Michelin, do Centro de Imunologia da Reprodução, por cederem as amostras, sem as quais este trabalho não existiria, por toda a sua parceria e contribuição.

À Dra. Pryscilla Fanini Wowk por todo o apoio e incentivo na concretização deste trabalho.

Aos membros do LIGH, pelo auxílio durante as diversas etapas deste trabalho.

À minha amiga Gorete pelo auxílio na coleta de material dos casais controle.

Às minhas amigas e companheiras de almoço Sibelle, Fabiana, Cláudia e Pryscilla, por todos os momentos engraçados, felizes e difíceis que passamos juntas e que sempre tentamos superar da melhor forma possível.

À minha amiga e companheira de laboratório Renata que esteve em todos os momentos deste trabalho ao meu lado, e meu amigo Samuel. Queria me desculpar por esse meu jeito meio tosco, meio sem jeito, meio insensível, meio..... Adoro vocês! Obrigada!

À minha amada mãe, Djanira, por todo o apoio e incentivo da vida inteira.

A Deus, por estar sempre presente na minha vida, tornando tudo possível e permitindo que todas essas pessoas maravilhosas façam parte da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	I
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. TECNOLOGIA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA (TRA).....	4
2.2. IMUNOLOGIA DA GESTAÇÃO	6
2.3. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC)	7
2.3.1 <i>Definição e Histórico</i>	7
2.3.2 <i>Organização genômica e estrutura molecular do MHC</i>	8
2.4. ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO G (HLA-G)	11
2.4.1. <i>Histórico e expressão do HLA-G</i>	11
2.4.2. <i>Estrutura do HLA-G</i>	12
2.4.3. <i>Polimorfismos do gene HLA-G</i>	15
2.4.4. <i>HLA-G e gestação</i>	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. OBJETIVO GERAL	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. JUSTIFICATIVA.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
8. ANEXOS	57
ANEXO 1 - MATERIAIS E MÉTODOS	58
Caracterização da Amostra	58
Extração de DNA.....	58
Determinação da Concentração de DNA.....	59
Tipagem do gene HLA-G pela técnica de sequenciamento automatizado	59
Amplificação dos exons 2, 3 e 4	60
Controle da amplificação	61
Purificação do produto amplificado.....	62
Reação de Sequenciamento	63
Precipitação do DNA sequenciado	64
Eletroforese Capilar.....	64
Tipagem de HLA-G	64
Quantificação de sHLA-G.....	65
Análise estatística	66
Análises comparativas de frequências gênicas	66
Análises de associação dos níveis séricos de sHLA-G	67
ANEXO 2 - TABELAS INTEGRAIS DE RESULTADOS	69
Frequências do gene HLA-G.....	69
Quantificação de sHLA-G.....	75
ANEXO 3 - FICHAS DE AVERIGUAÇÃO.....	76
ANEXO 4 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	80
ANEXO 5 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Características morfológicas embrionárias analisadas imediatamente antes da transferência	5
TABELA 2. Polimorfismos de DNA, definindo alelos do <i>HLA-G</i>	16
TABELA 3. Associação de alelos do <i>HLA-G</i> com níveis de sHLA-G	18
TABELA 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do loco <i>HLA-G</i>	60
TABELA 5. Reação de amplificação dos exons 2, 3 e 4 de <i>HLA-G</i>	60
TABELA 6. Condições de amplificação dos exon 2, 3 e 4 do gene <i>HLA-G</i>	61
TABELA 7. Reagentes utilizados na etapa de purificação	62
TABELA 8. Condições de ciclagem utilizadas na etapa de purificação.....	62
TABELA 9. Reagentes utilizados na reação de sequenciamento	63
TABELA 10. Condições de ciclagem para reação de sequenciamento do gene <i>HLA-G</i>	63
TABELA 11. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de sequenciamento	63
TABELA 12. Comparação das frequências alélicas do gene <i>HLA-G</i>	69
TABELA 13. Comparação das frequências alélicas do gene <i>HLA-G</i> entre as mulheres dos grupos paciente e controle	69
TABELA 14. Comparação das frequências alélicas do gene <i>HLA-G</i> entre os homens dos grupos paciente e controle	70
TABELA 15. Comparação das frequências genotípicas do gene <i>HLA-G</i>	70
TABELA 16. Comparação das frequências genotípicas do gene <i>HLA-G</i> entre as mulheres dos grupos paciente e controle.....	71
TABELA 17. Comparação das frequências genotípicas do gene <i>HLA-G</i> entre os homens dos grupos paciente e controle	72
TABELA 18. Comparação dos portadores de alelos do gene <i>HLA-G</i>	73
TABELA 19. Comparação dos portadores de alelos do gene <i>HLA-G</i> entre as mulheres dos grupos paciente e controle	73
TABELA 20. Comparação dos portadores de alelos do gene <i>HLA-G</i> entre os homens dos grupos paciente e controle	74
TABELA 21. Comparação entre as concentrações de sHLA-G entre pacientes e controles.	75
TABELA 22. Associação entre alelos do gene <i>HLA-G</i> e níveis de sHLA-G	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Múltiplos mecanismos que levam à tolerância materno-fetal.	7
Figura 2. Estrutura das moléculas de Classe I e de Classe II do MHC.	10
Figura 3. Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano	11
Figura 4. Processamento alternativo e isoformas do gene HLA-G.	14
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1%.....	61
Figura 6. Exemplo de eletroferograma analisado	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DGP	- Diagnóstico Genético Pré-implantacional
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DTT	- Ditioneitol
EDTA	- <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
FIV	- Fertilização <i>In vitro</i>
FPI	- Falha Primária de Implantação
FSH	- <i>Follicle-Stimulating Hormone</i> (hormônio folículo estimulante)
GnRH	- <i>Gonadotropin-releasing hormone</i> (hormônio liberador de gonadotrofina)
HCG	- <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> (gonadotrofina coriônica humana)
HLA	- <i>Human Leucocytes Antigens</i> (Antígenos Leucocitários Humanos)
HLA-G	- <i>Human Leucocytes Antigens - G</i> (Antígenos Leucocitários Humanos - G)
HRP	- <i>Enzyme Horseradish Peroxidase</i> (enzima peroxidase)
ICSI	- Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
Igs	- Imunoglobulinas
IUI	- Inseminação Intra-uterina
IL	- Interleucina
ILT2	- <i>Ig-like transcript 2</i> (receptores inibitórios humanos)
ILT4	- <i>Ig-like transcript 4</i> (receptores inibitórios humanos)
IMGT	- Sistema de Informação Internacional de Immunogenética
INF- γ	- Interferon-gama
kb	- Quilobases
kDa	- Quilodaltons
KIR2DL4	- <i>Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4</i>
MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
MIV	- Maturação <i>In vitro</i>
NK	- <i>Natural Killer Cells</i> (células assassinas naturais)
OR	- <i>Odds Ratio</i> (razão de probabilidades)
pb	- Pares de Base
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RCLB	- Tampão de Lise de Células Vermelhas
RNA _m	- Ácido Ribonucleico (mensageiro)
RR	- Risco Relativo
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
sHLA-G	- HLA-G solúvel
SNPs	- Polimorfismo de um único nucleotídeo
Th2	- <i>T helper 2</i> (citocina do tipo Th2, citocina anti-inflamatória)
TMB	- Tetrametilbenzidina
TNF	- <i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TRA	- Tecnologia de Reprodução Assistida
Treg	- Células T reguladoras
3'UTR	- Região 3' transcrita e não-traduzida
5'UTR	- Região 5' reguladora transcrita e não traduzida
WHO	- <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

O antígeno leucocitário humano (*HLA*)-G é um gene HLA-classe Ib (não clássico), que tem papel na resposta imune inata e adaptativa. O *HLA-G* é expresso não apenas como uma proteína de membrana ligada à superfície de alguns tipos celulares, mas também como uma proteína solúvel em fluidos corporais. A expressão do *HLA-G* está relacionada ao sistema imunológico materno durante a gestação como um modulador imunológico de tolerância materno-fetal, e seus níveis estão positivamente correlacionados com o resultado da gestação. O objetivo desse estudo é o de investigar uma possível associação entre a variabilidade genética dos exons 2, 3 e 4 do gene *HLA-G* e o nível sérico de sHLA-G em casos de falha de implantação embrionária. A amostra paciente foi composta de 40 casais, não aparentados, com diagnóstico de falha de implantação embrionária, após pelo menos duas transferências de embriões não-criopreservados. A amostra controle foi composta de 83 casais, não aparentados, com pelo menos duas gestações clínicas naturais, a termo, sem complicações. O gene *HLA-G* foi genotipado por sequenciamento direto de DNA. Os alelos do *HLA-G* foram definidos por variações na sequência de nucleotídeos dos exons 2, 3 e 4, e a quantificação de sHLA-G foi realizada através do método ELISA. A análise estatística não revelou diferença significativa entre os níveis de sHLA-G apresentados pelo grupo com falha de implantação e pelo grupo controle, mas revelou diferença significativa na distribuição alélica entre esses grupos. O alelo *HLA-G*01:03:01* foi mais frequente nos casais pertencentes ao grupo com falha de implantação (22,22%) se comparado aos casais pertencentes ao grupo controle (5,98%). Os resultados apresentados no estudo sugerem que os produtos do gene *HLA-G* podem exercer um papel importante na modulação da resposta imune materno-fetal.

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade é uma patologia que afeta 12 a 15% dos casais em idade reprodutiva (<http://www.embic.org>) e tem sido definida como a incapacidade de um casal gerar descendentes, após 12 meses de relações sexuais desprotegidas e freqüentes. Mulheres que tentaram, mas nunca conceberam um filho são classificadas como inférteis primárias, enquanto as mulheres que já possuem um filho e são incapazes de conceber posteriormente são classificadas como inférteis secundárias (PAULI *et al.*, 2009).

O desenvolvimento da tecnologia de reprodução assistida (TRA) tem modificado esta condição para muitos casais. Na década de 90, foram alcançados importantes avanços nos aspectos clínicos e laboratoriais com resultados de impacto, porém os procedimentos baseados na TRA permanecem com uma considerável taxa de insucesso intrínseco (SHARMA, ALLGAR & RAJKHOWA, 2002).

A TRA oferece atualmente diferentes procedimentos que incluem a inseminação intra-uterina (IIU), a fertilização *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Também estão disponíveis as possibilidades de criopreservação de oócitos, de espermatozoides e de embriões para procedimentos futuros (DICKY, 2007). Cada uma destas opções apresenta uma taxa de sucesso variável, dependente da combinação de inúmeros fatores além da técnica propriamente dita (FARR, SCHIEVE & JAMIESON, 2007).

Aproximadamente, 31% das gestações normais resultam em abortos e uma significativa proporção dessas perdas gestacionais (41%) são relatadas como perdas gestacionais sem causa aparente. Dentre as gestações por FIV, 51,4% das transferências embrionárias resultam em implantação do embrião. Destas implantações, 33,7% resultam em perdas gestacionais pré-clínicas, 3,7% em gestações bioquímicas e 14,9% em abortos clínicos (KWAK-KIM *et al.*, 2010).

O sucesso dos procedimentos baseados na TRA encontra um ponto crítico no processo de implantação embrionária. No caso de gestação normal, as células do sinciotrofoblasto constituem alvo de ligação de anticorpos maternos dirigidos contra as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) paternas, expressos nos tecidos embrionários. Estes anticorpos são conhecidos como

“anticorpos bloqueadores” da atividade citotóxica direta pelas células *Natural Killer* (NK) decíduais e, sua produção esta associada a uma modificação do perfil de citocinas na interface materno-fetal, direcionando-as no sentido Th2 (citocinas anti-inflamatórias), perfil esse comumente associado a uma implantação bem sucedida. Acredita-se que o objetivo final de tais anticorpos seja o de proteger a interface materno-fetal, via *HLA-G*, bloqueando, dessa forma, a citotoxicidade local (MICHELON *et al.*, 2006; MINCHEVA-NILSSON *et al.*, 2007).

Além disso, a implantação embrionária humana é um processo extremamente complexo que requer tanto a habilidade do embrião de se implantar no útero, quanto a receptividade adequada do endométrio materno. Diversas evidências são sugestivas de que, durante este processo, tanto o embrião quanto o endométrio estimulam adaptações no sistema imune materno para o estabelecimento de uma gravidez viável. Nas duas últimas décadas, a identificação de genes de antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe-Ib, com enfoque no *HLA-G*, gerou conhecimento sobre o processo da imunomodulação durante a gestação, seja durante uma gravidez normal ou patológica ou durante a implantação embrionária (FANCHIN *et al.*, 2007).

Devido ao fato do *HLA-G* estar envolvido na gravidez, o levantamento de hipóteses da utilização do *HLA-G* como possível marcador diagnóstico, prognóstico e terapêutico tornou-se intenso, visto o número de publicações ter crescido de 10 em 1989 para 300 até 2007 (CAROSELLA *et al.*, 2008-a).

A produção do *HLA-G* por embriões pré-implantacionais pode estar envolvida em mecanismos de garantia do estabelecimento correto de comunicação na interface materno-fetal e posterior sucesso na implantação. A possibilidade de identificar a produção de *HLA-G* por embriões criaria novas possibilidades de melhoramento dos tratamentos por FIV, especificamente com enfoque na seleção de embriões e redução nas taxas de insucesso de implantação (FANCHIN *et al.*, 2007).

Formas solúveis do *HLA-G*, originadas do processamento alternativo do RNAm de *HLA-G* e detectadas através do sangue materno, parecem estar também relacionadas à implantação embrionária por promoverem receptividade endometrial. Os mecanismos que envolvem todo este processo permanecem desconhecidos e, conseqüentemente, estimulam a produção de estudos para que se possa esclarecer e refinar a informação quanto à relação entre *HLA-G* (função, expressão e polimorfismos) e mecanismos reprodutivos (FANCHIN *et al.*, 2007).

Com base nestas evidências o presente estudo tem por objetivo a realização de estudo caso-controle, para investigar a associação entre falha de implantação embrionária e a variabilidade genética dos exons 2, 3 e 4 do gene *HLA-G* e seus níveis séricos solúveis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tecnologia de Reprodução Assistida (TRA)

A TRA é a última opção para casais com diagnóstico de infertilidade que já foram submetidos a investigação e tratamento de fatores eventualmente associados, em escala crescente de complexidade. Essa técnica foi aplicada pela primeira vez em 1978, como estratégia para suplantir uma oclusão completa das tubas uterinas. Desde então, as indicações para a TRA têm sido expandidas, incluindo outras causas de infertilidade, como: infertilidade de causa masculina; endometriose associada à infertilidade; infertilidade de causa imunológica e infertilidade sem causa aparente (PINHEIRO *et al.*, 1999).

A técnica de FIV, inicialmente, era baseada na utilização de um único folículo ovariano produzido durante um ciclo menstrual natural, sendo uma técnica pouco eficiente, com taxas menores de gravidez. Por esta razão, novos protocolos foram desenvolvidos, visando induzir a maturação de múltiplos folículos ovarianos através da utilização do análogo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) via parenteral. O protocolo de estimulação para cada paciente deve ser selecionado baseado em dados como: idade; causa da infertilidade; reserva ovariana; priorizando o histórico de tratamentos de cada paciente (PAULI *et al.*, 2009).

Existem diversos protocolos básicos para o estímulo de uma “superovulação”, dentre eles um protocolo padrão que se baseia em três etapas: a) administração diária via subcutânea do GnRH iniciada em torno do vigésimo primeiro dia do ciclo menstrual para induzir supressão pituitária (usualmente é alcançada em 10 a 14 dias); b) administração diária, via subcutânea, de hormônio folículo estimulante (FSH) recombinante, após a supressão pituitária, durante 10 a 14 dias; c) administração subcutânea de uma única dose de gonadotrofina coriônica humana (HCG), após o folículo alcançar um tamanho maduro superior a 14 mm (PAULI *et al.*, 2009).

A recuperação do oócito é realizada através de aspiração por agulha guiada por ultra-som transvaginal, com sedação consciente, 34 a 38 horas após a administração de HCG. O fluido folicular obtido é examinado para a captura de oócito, acompanhado de massa acumulada de células granulosas, sendo que

usualmente são capturados cerca de 10 a 20 óócitos. Estes são então colocados em meio de cultivo baseado em fluido de tubo falopiano humano e incubados a 37°C. Cerca de 100.000 a 200.000 espermatozóides são adicionados ao meio contendo óócitos, ou é realizada a injeção direta de um único espermatozóide em um óócito através de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). A fertilização pode ser observada após 12 a 20 horas pela presença dos pro-núcleos feminino e masculino (GOLDBERG, FALCONE & ATTARAN, 2007).

Os embriões, aos quais foram atribuídos um melhor grau morfológico (transferências realizadas até o grau III) (Tabela 1), serão selecionados para a transferência ao útero, três dias após a recuperação do óócito e consequente fertilização, sendo este procedimento realizado com o auxílio de um cateter flexível transcervical. A administração de progesterona exógena é realizada após a transferência, com o intuito de complementar a aceitação do endométrio ao embrião implantado. Sua administração pode ser via intramuscular ou por formulações vaginais, durante a fase lútea até a oitava à décima semana de gestação. Um diversificado número de procedimentos técnicos são realizados para garantir uma alta taxa de sucesso e reduzir riscos da FIV, como a ICSI, auxílio no desprendimento do embrião da zona pelúcida, diagnóstico genético pré-implantacional (DGP), maturação *in vitro* (MIV) e criopreservação de óócitos e tecido ovariano (PAULI *et al.*, 2009).

TABELA 1: Características morfológicas embrionárias analisadas imediatamente antes da transferência

Grau	Características Morfológicas
I	Blastômeros com ausência de fragmentação citoplasmática
II	Blastômeros com tamanhos iguais ou diferentes e com menos de 25% de fragmentação citoplasmática em cada blastômero
III	Blastômeros com tamanhos iguais ou diferentes e com fragmentação citoplasmática em cada blastômero entre 25 e 50%
IV	Blastômeros com tamanhos desiguais e fragmentação citoplasmática recobrando mais de 50% da superfície individual dos blastômeros

Fonte: www.redlara.com

2.2. Imunologia da Gestação

A gestação constitui um fenômeno ímpar no organismo humano no que se refere ao comportamento do sistema imune. Data de 1953 o lançamento da hipótese de Sir Peter Medawar de que o embrião se comporta no organismo materno como um enxerto semi-alogênico, estando, portanto, vulnerável às teorias de rejeição e tolerância imunológica (MEDAWAR, 1953).

De fato, o embrião contém metade do material genético herdado da mãe e a outra metade do material genético herdado do pai. Por essa razão, pelo menos no que se refere ao componente paterno expresso no embrião, o mesmo será estranho ao sistema imune da mãe, que deverá abrigá-lo durante toda a gestação. A metade dos genes herdados do pai deverá ser expressa e, muitos deles poderão atuar como aloantígenos, sendo alvo de reconhecimento imune materno, uma vez que a mãe está exposta aos antígenos fetais durante a gravidez. No entanto, raramente ocorre um episódio de rejeição por parte da mãe ao feto, pois vários mecanismos moleculares de imunossupressão local provavelmente estão envolvidos na proteção do feto (ABBAS, LICHTMAN & POBER, 2003; MICHELON *et al.*, 2006)

A placenta humana é a interface entre a mãe e o feto, transportando nutrientes para ele e secretando múltiplas proteínas e produtos esteróides críticos para a manutenção da gestação. A cooperação física e química entre a mãe e o feto na formação da placenta é o fenômeno mais cuidadosamente orquestrado no desenvolvimento fetal. Este passo representa a cooperação de dois indivíduos distintos (mãe e pai) para formar um terceiro (filho), o qual é capaz de proteger e permitir a sobrevivência de genes paternos e maternos (AGRAWAL & PANDEY, 2003).

Entre os fatores envolvidos nessa intrincada rede imunomoduladora para a tolerância e regulação do desenvolvimento fetal e formação da placenta, destacam-se: a influência hormonal sobre o sistema imune materno; o reconhecimento das moléculas do MHC expressos pelo embrião; as citocinas liberadas no meio; o controle da citotoxicidade direta das células NK e a atividade das células T reguladoras (Treg) (Figura 1) (HUNT *et al.*, 2005).

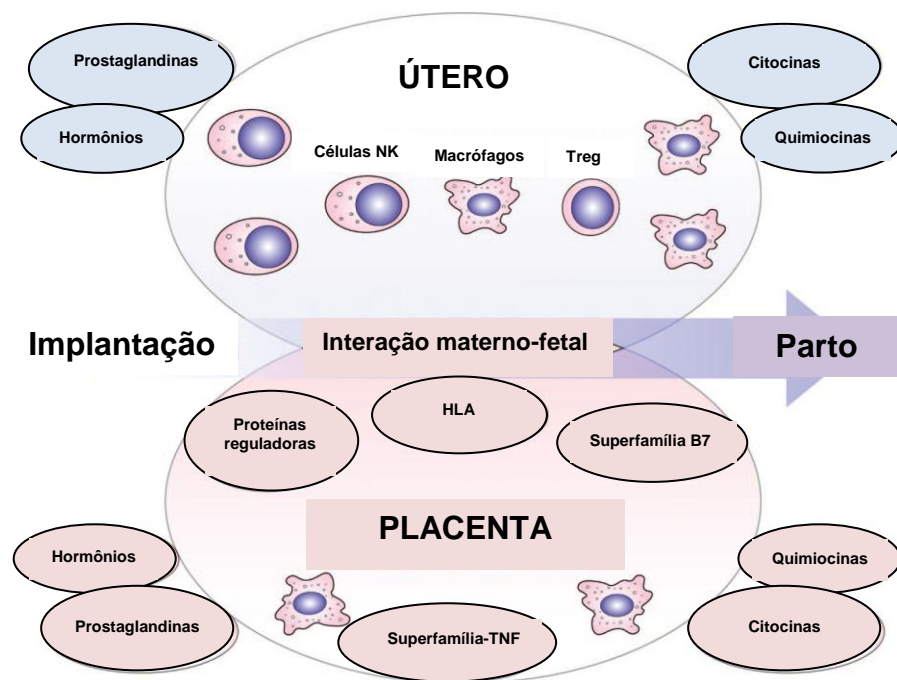


Figura 1. Múltiplos mecanismos que levam à tolerância materno-fetal. A mãe via adaptações que ocorrem no útero e no feto, e via adaptações especiais da placenta, contribui para o estabelecimento de um ambiente imune privilegiado para o desenvolvimento do feto semi-alógeno. Fonte: Adaptado de HUNT *et al.*, 2005.

2.3. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)

2.3.1 Definição e Histórico

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (do Inglês *Major Histocompatibility Complex*), designado pela sigla MHC, foi descrito pela primeira vez no ano de 1936, em camundongos, e recebeu esta denominação devido a sua influência no sucesso ou fracasso de transplantes de tecidos nesses animais. As primeiras moléculas foram descritas como antígenos polimórficos da superfície celular, e codificadas por um locus gênico denominado H-2. Os produtos destes loci constituem a principal barreira imunológica aos transplantes de aloenxertos. Esses antígenos foram denominados antígenos de histocompatibilidade e são codificados por genes de mesmo nome. Posteriormente, complexos gênicos homólogos que codificam produtos moleculares envolvidos na resposta imune foram descritos em várias espécies de mamíferos (DUNHAM *et al.*, 1987).

O MHC humano só foi descoberto na década de 50, por Dausset, Payne e Van Rood. Ao realizarem estudos sorológicos em pacientes transfundidos, perceberam diferenças antigênicas entre leucócitos de diferentes indivíduos. Por isso, esses antígenos foram chamados Antígenos Leucocitários Humanos ou genes HLA (do inglês *Human Leukocyte Antigen*) (LAMM & OLASEN, 1985; BELL, 1989; HYLENIUS *et al.*, 2004).

O sistema gênico HLA faz parte do Complexo Principal de Histocompatibilidade humano. Esses genes organizam-se e classificam-se em genes MHC da região de Classe I e de Classe II, de acordo com a estrutura e a função de seus produtos moleculares. Atualmente, sabe-se que o papel biológico das proteínas HLA relaciona-se à sua ligação com uma grande variedade de peptídeos antigênicos e sua apresentação aos linfócitos T. As moléculas Classe I apresentam peptídeos aos linfócitos citotóxicos CD8+, e as moléculas Classe II apresentam peptídeos às células T auxiliares CD4+ (ABBAS, LICHTMAN & PILLAY, 2008).

Peptídeos derivados de proteínas degradadas no citosol associam-se a moléculas MHC de Classe I e peptídeos derivados de proteínas degradadas nas vesículas endocíticas associam-se a moléculas MHC de Classe II. Os genes MHC são expressos de forma co-dominante em cada indivíduo e constituem o sistema com o maior número de genes do genoma. (JANER & GERAGHTY, 1998; JANEWAY *et al.*, 2002).

2.3.2 Organização genômica e estrutura molecular do MHC

Nos seres humanos, o MHC está localizado no braço curto do cromossomo 6, ocupando um grande segmento de DNA, estendendo-se por aproximadamente 4 Mb, codificando, pelo menos, 130 genes funcionais (HVIID TV, 2006). O conjunto de alelos do MHC presente em cada cromossomo é denominado de haplótipo MHC e cada indivíduo apresenta dois haplótipos, um de origem materna e outro de origem paterna. As proteínas de Classe I e de Classe II do MHC apresentam estrutura geral muito semelhante. Ambas são heterodímeros transmembrana, com domínios N-terminais extracelulares, onde situam-se a fenda de ligação ao peptídeo para apresentá-los às células T (ALBERTS *et al.*, 2004); uma região que atravessa a membrana e que permite sua ancoragem, e uma região intracelular. As moléculas

MHC de Classe I compreendem aquelas referenciadas como MHC de Classe I Clássicas, HLA-A, HLA-B e HLA-C e MHC de Classe I não-Clássicas (ou MHC de Classe Ib), HLA-E, HLA-F e HLA-G. Diversas características diferenciam as moléculas MHC de Classe I clássicas das moléculas MHC de Classe I não-clássicas, como seu menor número de alelos e diferentes mecanismos de regulação gênica que levam a uma distribuição restrita de expressão protéica a apenas alguns tecidos específicos. As moléculas MHC de Classe II são denominadas pelas siglas HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP (PAUL P *et al.*, 2000; VAN DEN ELSEN *et al.*, 2001; JANEWAY *et al.*, 2002;).

Os genes de Classe I encontram-se próximos ao telômero do braço curto do cromossomo 6 e codificam a cadeia α das proteínas MHC de Classe I, que se estruturam associando-se não covalentemente a β 2-microglobulina (Figura 2). A β 2-microglobulina é codificada por um gene que não se localiza junto ao grupo dos genes do MHC, e está situado no cromossoma 15. A cadeia α apresenta três domínios globulares extracelulares (α 1, α 2 e α 3); o domínio α 3 e a proteína β 2-microglobulina encontram-se próximos à membrana, gerando uma estrutura similar a um domínio de Ig. O domínio N-terminal da cadeia α , que se encontra mais afastado da membrana, contém os aminoácidos que são reconhecidos pelas células T. Esses domínios ligam-se a peptídeos e os apresentam às células T citotóxicas (ABBAS, LICHTMAN & PILLAY, 2008; ALBERTS *et al.*, 2004).

Os genes de Classe II situam-se na região mais centromérica do MHC e codificam proteínas semelhantes às proteínas de Classe I, heterodímeros que apresentam domínios semelhante aos das imunoglobulinas (Ig), com regiões constantes próximas à membrana e dois domínios N-terminais (α 1, β 1) polimórficos mais distantes da membrana. As moléculas de Classe II são constituídas de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente: uma cadeia α de 32 a 34 kDa e uma cadeia β de 29 a 32 kDa, ambas codificadas por genes MHC polimórficos (Figura 2). Os segmentos N-terminais α 1 e β 1 das cadeias de Classe II interagem para formar a fenda de ligação de antígenos. Nas moléculas de Classe II dos seres humanos a maior parte do polimorfismo está na cadeia β . Os dois domínios polimórficos ligam-se à peptídeos e apresentam-nos para as células T auxiliares (ABBAS, LICHTMAN & PILLAY, 2008; ALBERTS *et al.*, 2004).

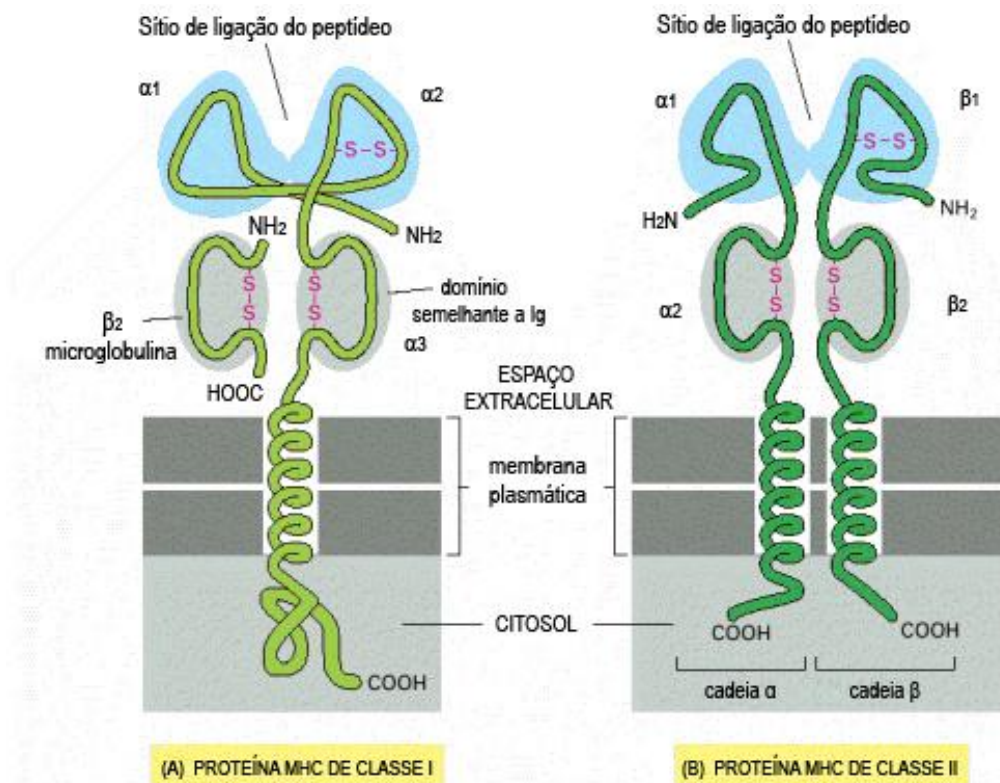


Figura 2. Estrutura das moléculas de Classe I e de Classe II do MHC. (a) As cadeias α das moléculas de Classe I possuem três domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, que são codificados por exons separados. Estes encontram-se associados de forma não covalente a uma pequena cadeia polipeptídica, a $\beta 2$ -microglobulina, que não é codificada dentro da mesma região do MHC. Enquanto a $\beta 2$ -microglobulina é invariante, a cadeia α é polimórfica. (b) Nas proteínas do MHC de Classe II, ambas as cadeias são polimórficas, principalmente os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A4491>

A região de Classe III que apresenta alta densidade gênica, encontra-se entre as regiões de Classe-I e II (Figura 3). Nesta região localizam-se os genes que codificam componentes do sistema do complemento e moléculas de citocinas (ABBAS, LICHTMAN & PILLAY, 2008). A Figura 3 representa esquematicamente a região MHC humana.

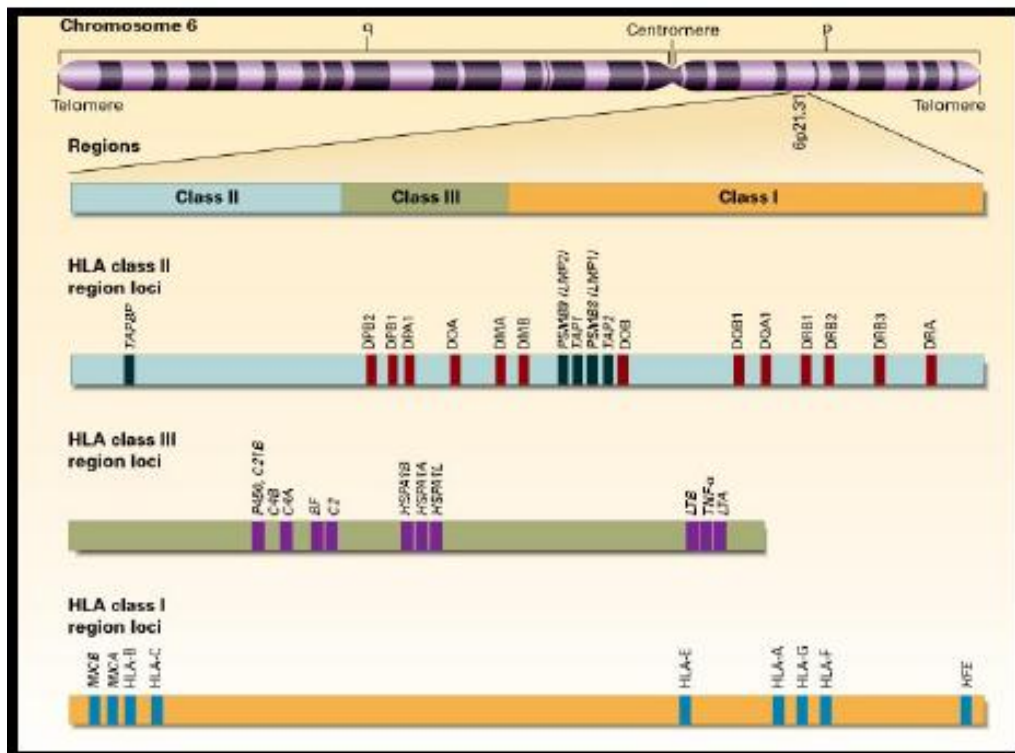


Figura 3. Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano. Em laranja, está representada a região de classe I, em azul a região de classe II e em verde a região de classe III. Fonte: http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/ klei.fig1.jpg

2.4. Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G)

2.4.1. Histórico e expressão do HLA-G

O gene *HLA-G* foi descrito pela primeira vez por Geraghty *et al* em 1987. Em 1990, ficou evidente que esse gene codificava uma molécula presente no citotrofoblasto extraviloso, com provável papel na indução da tolerância materno-fetal. O RNAm do *HLA-G* pode ser detectado em uma grande variedade de tipos celulares, incluindo o citotrofoblasto extraviloso, a câmara anterior do olho, o timo fetal, o fígado fetal no primeiro trimestre, linfócitos periféricos adultos, embriões pré-implantacionais e fagócitos mononucleares. Desde a observação inicial da expressão do *HLA-G* na interface materno-fetal, há muita especulação sobre o papel deste gene na gestação (OBER & ALDRICH, 1997).

A presença do *HLA-G* também tem sido observada em células tumorais e especula-se que a expressão de algumas das isoformas do *HLA-G* seja uma das

estratégias para que as metástases evadam da resposta imune (ROUAS-FREISS *et al.*, 2005).

O gene *HLA-G*, também é estudado no contexto dos transplantes de tecidos alogênicos (aloenxerto). A expressão de algumas isoformas da molécula do *HLA-G* nos tecidos do órgão enxertado poderia reduzir o risco de rejeição por parte do organismo do receptor (PIRRI *et al.*, 2009).

Sob condições patológicas, o *HLA-G* é expresso durante doenças inflamatórias (inflamações musculares), esclerose múltipla, aloenxertos não rejeitados, tumores e no curso da infecção pelo HIV. Estudos têm demonstrado que tanto as formas solúveis do *HLA-G*, quanto às formas ancoradas à membrana, são capazes de inibir a proliferação de células T e células NK citotóxicas. Além disso, as formas solúveis de *HLA-G* podem se ligar ao co-receptor CD8 e induzir a apoptose de células T CD8⁺ ativadas e das células NK. O *HLA-G* exerce suas funções inibitórias através da interação com três receptores inibitórios: ILT2; ILT4 e KIR2DL4. O ILT2 é amplamente expresso por células linfóides e mielóides, enquanto que a expressão de ILT4 é específica para células mielóides, e a expressão de KIR2DL4 é restrita à células NK. Os receptores ILT2 e ILT4 podem interagir com moléculas HLA de Classe I clássicas, mas tem uma maior afinidade por *HLA-G*, enquanto que o *HLA-G* é o único ligante conhecido do receptor KIR2DL4 (LEMAOULT *et al.*, 2005).

2.4.2. Estrutura do *HLA-G*

O gene *HLA-G* está localizado telomericamente ao *HLA-A*, no braço curto do cromossomo 6 (OBER & ALDRICH, 1997). A organização gênica do *HLA-G* é similar à organização dos genes de Classe I (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*), compostos de 8 exons, 7 íntrons e uma região 3' não traduzida (3'UTR) (OBER & ALDRICH, 1997; VAN DER VEN, PFEIFFER & SKRABLIN, 2000).

O *HLA-G* possui 4396 pb. O exon 1 (73 pb) codifica um peptídeo sinal, o exon 2 (270 pb) codifica o domínio $\alpha 1$, o exon 3 (276 pb) codifica o domínio $\alpha 2$ e o exon 4 (276 pb) codifica o domínio $\alpha 3$. O exon 5 (114 pb) codifica a região transmembrana. Os exons 6, 7 e 8 totalizam 115 pb e codificam o domínio citoplasmático da molécula e a região 3' não traduzida, respectivamente (OBER & ALDRICH, 1997; CAROSELLA *et al.*, 1999). Além disso, a existência de um códon de término no exon

6 leva à produção de uma proteína truncada com a perda de 19 resíduos de aminoácidos, que nas moléculas HLA clássicas são altamente conservados (OBER & ALDRICH, 1997).

Uma das características dos transcritos primários do *HLA-G* é o processamento alternativo, responsável pela produção de sete isoformas de proteínas distintas. Quatro destas são ligadas à membrana (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4) e outras três isoformas são proteínas solúveis (HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7) (BAINBRIDGE *et al.*, 2001; LILA *et al.*, 2002). As isoformas ligadas à membrana e as solúveis compartilham a mesma estrutura extracelular e diferem na sua região C-terminal. As isoformas ligadas à membrana apresentam uma região transmembrana (codificada pelo exon 5) e uma cauda intracitoplasmática (codificada pelos exons 6 – 8), as formas solúveis substituem esta estrutura por uma pequena cauda hidrofílica codificada pela sequência 5' do intron 4 (HLA-G5 e G6) ou intron 2 (HLA-G7) (ROUSSEV & COULAM, 2007).

A isoforma HLA-G1 contém os domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ e ancora-se na membrana por meio de domínio transmembrana e estende-se intracelularmente através de uma cauda citoplasmática curta. Essa cauda citoplasmática menor é devido a presença de um códon de término de leitura no exon 6, quando comparada às moléculas HLA clássicas. As isoformas HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4 compartilham essa mesma estrutura de ancoragem à membrana, e a cauda citoplasmática mais curta, diferindo no segmento extracelular. Na isoforma HLA-G2, a recomposição alternativa dos exons exclui o exon 3 e como resultado, apenas os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 3$ estão presentes. A exclusão dos exons 3 e 4 gera a isoforma HLA-G3, que retém somente o domínio $\alpha 1$ unido a região transmembrana. A exclusão do exon 4 gera a isoforma HLA-G4, que retém os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ unidos a região transmembrana (Figura 4) (PAUL *et al.*, 2000; OBER *et al.*, 2003).

As isoformas solúveis do HLA-G ocorrem devido à inclusão da sequência do íntron 4 no mRNA, o qual contém um códon de término de leitura, fazendo com que a região de ancoragem à membrana não seja transcrita, resultando em proteínas solúveis. HLA-G1 e HLA-G2 são expressos como isoformas solúveis (SARGENT, 2005). A isoforma solúvel de HLA-G1 é chamada de sHLA-G1 ou HLA-G5 e a isoforma solúvel de HLA-G2 é denominada como sHLA-G2 ou HLA-G6. A isoforma solúvel HLA-G5 contém os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ mais 21 aminoácidos provenientes do íntron 4. A isoforma solúvel HLA-G6 contém os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ mais os 21

aminoácidos do íntron 4 (PAUL *et al.*, 2000; ROUSSEV & COULAM, 2007). A isoforma HLA-G7 retém o íntron 2, que contém um códon de parada, resultando em uma proteína solúvel com somente o domínio $\alpha 1$ (SARGENT, 2005).

Funcionalmente, HLA-G1 inibe as funções citolíticas das células NK, a função citolítica antígeno-específica dos linfócitos T citotóxicos, a resposta aloproliferativa das células T CD4⁺, a proliferação das células T e das células NK e a maturação e função das células dendríticas. A isoforma solúvel sHLA-G1 (HLA-G5), que é gerada pela clivagem da membrana celular, possui funções similares. As demais isoformas do HLA-G têm sido menos estudadas e sabe-se pouco a respeito de suas funções, exceto que as isoformas ligadas à membrana HLA-G2, HLA-G3, e HLA-G4 podem inibir a citotoxicidade das células NK e linfócitos T citotóxicos *in vitro*. (CAROSELLA *et al.*, 2008-b).

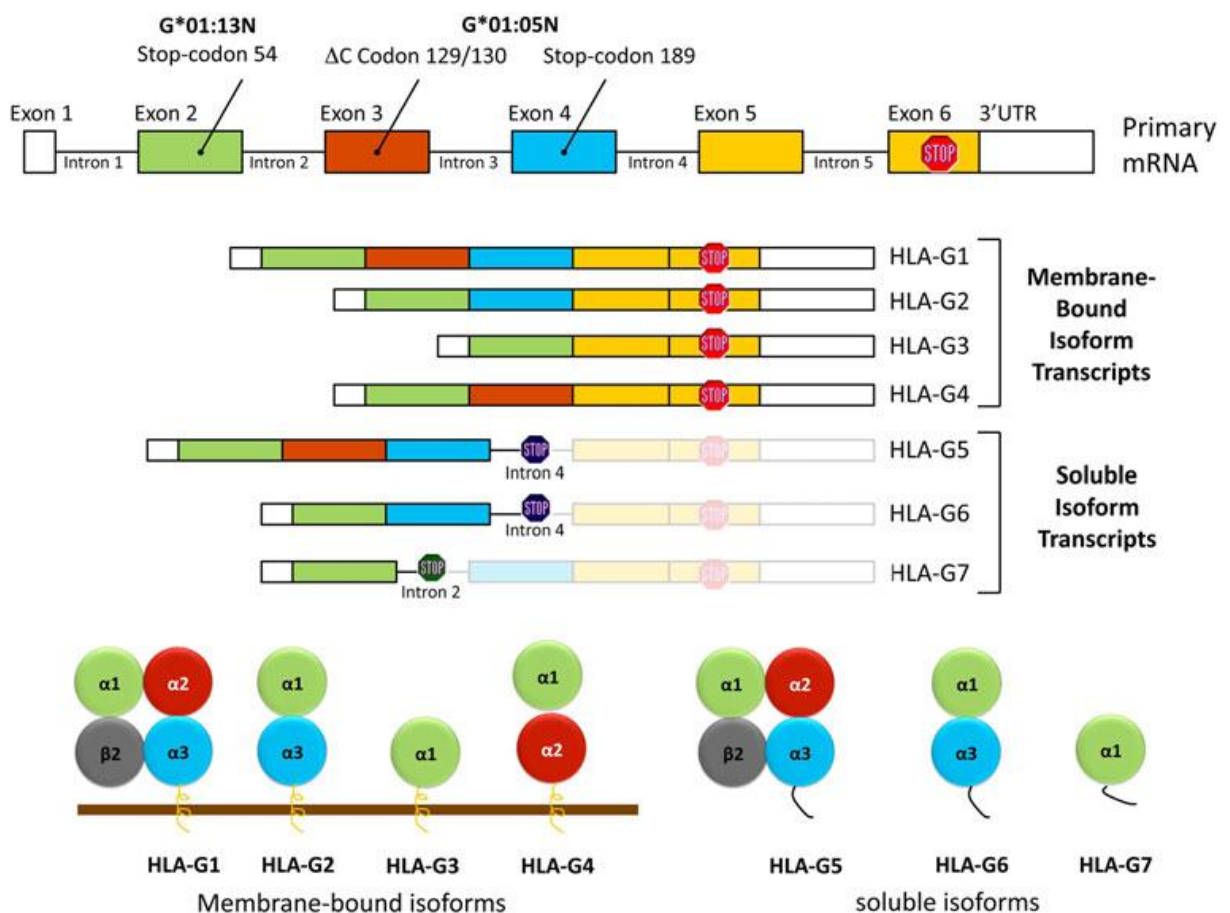


Figura 4. Processamento alternativo e isoformas do gene HLA-G. Uma das características dos transcritos primários de *HLA-G* é o processamento alternativo, responsável pela produção de sete isoformas de proteínas. Quatro isoformas são ligadas à membrana (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4) e as outras três são proteínas solúveis devido a não transcrição da região de ancoragem à membrana (HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7). Fonte: DONADI *et al.*, 2011.

2.4.3. Polimorfismos do gene *HLA-G*

Os genes da Classe Ia constituem o sistema com mais genes polimórficos do genoma humano. O grau e o padrão de polimorfismo nos genes da Classe Ia estão de acordo com a hipótese de que a seleção atua nestes loci, mantendo altos níveis de variabilidade, particularmente nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, nos sítios que interagem diretamente com o peptídeo ligado. Assim, foi surpreendente perceber que o gene *HLA-G* (Classe Ib) apresentou-se com níveis muito baixos de variação de sequência em quase todas as populações estudadas. Uma exceção encontra-se em amostras da população africana, a qual mostra extensa diversidade em nucleotídeos e correspondentes aminoácidos, principalmente no domínio $\alpha 2$ do *HLA-G* (OBER & ALDRICH, 1997).

Diferenças quanto à localização, natureza e frequência relativa do polimorfismo do *HLA-G* parecem existir entre diferentes grupos étnicos, apesar de certas variações nucleotídicas serem compartilhadas por todas as populações estudadas sugerindo uma origem comum de alelos do *HLA-G*. A grande maioria dos polimorfismos do *HLA-G* é sinônimo e, portanto, não alteram a composição de aminoácidos da proteína *HLA-G* (VAN DER VEN, PFEIFFER & SKRABLIN, 2000).

De acordo com os dados presentes na página eletrônica do Instituto de Pesquisa Anthony Nolan (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>), até a data 09 de agosto de 2011, conhecem-se 47 alelos do *locus HLA-G*, 15 produtos protéicos e 2 alelos nulos. Existem apenas cinco alelos com substituições únicas de aminoácidos descritas na literatura quanto à proteína *HLA-G*, localizadas fora do sítio de ligação de peptídeos. Duas substituições de aminoácidos são encontradas no exon 2 (definindo os alelos *G*01:02* e *G*01:03*), uma substituição é encontrada no exon 3 (definindo os alelos de *G*01:04:0x*), uma substituição encontrada no exon 4 (definindo o alelo *G*01:06*). A definição da maioria dos alelos do *HLA-G* é baseada no polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs) que mudam a matriz de leitura e consequentemente as sequências de aminoácidos da proteína *HLA-G*. Cada variação nucleotídica silenciosa (sinônima) define a variante alélica específica. (Tabela 2) (VAN DER VEN, PFEIFFER & SKRABLIN, 2000; HVIID, 2006).

O *HLA-G*01:05* é um alelo nulo devido a uma deleção de nucleotídeo (1597delC) na primeira base do códon 130, ou última base do códon 129, resultando

em mudança na matriz de leitura e definindo o alelo *G*01:05N*. Todos os aminoácidos restantes do exon 3 são alterados por essa deleção. Além disso, esta deleção pode resultar em um códon de parada no início do exon 4 (no domínio $\alpha 3$), resultando em uma proteína truncada. É previsto que a proteína HLA-G1 codificada pelo alelo *G*01:05N* pode não ser funcional. A proteína HLA-G2 pode não ser afetada por esta mutação porque o exon 3 não faz parte desta isoforma (OBER & ALDRICH, 1997; HVIID, 2006).

TABELA 2. Polimorfismos de DNA, definindo alelos do *HLA-G*

<i>HLA-G</i> alleles	5'URR/ promotor*	Exon 2						Exon 3				Exon 4				3'UTR* (nt 3741)	
		-725	-201	31	35	54	57	69	93	100	107	110	130	188	236	241	258
<i>G*010101</i>	C or G	G	ACG	CGG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGC	GGA	CTC	CTG	CAC	GCA	TTC	ACG	-
<i>G*010102</i>	C	A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	+14 bp
<i>G*010103</i>	C	A	---	---	---	--A	---	---	---	--T	---	---	---	---	-C-	---	+14 bp
<i>G*010104</i>	C	G	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	nd	nd	nd	nd	nd
<i>G*010105</i>	nd	nd	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	-
<i>G*010106</i>	nd	nd	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	nd
<i>G*010107</i>	nd	nd	---	---	---	--A	---	--T	---	--T	---	---	---	---	---	---	nd
<i>G*010108</i>	C	G	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-
<i>G*0102</i>	nd	nd	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	nd
<i>G*0103</i>	C (or T)	G	T--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*010401</i>	C	A	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	-
<i>G*010402</i>	nd	nd	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	A--	---	--T	---	---	nd
<i>G*010403</i>	nd	nd	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	-
<i>G*0105N</i>	C	A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	•TG	---	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*0106</i>	C	A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	-T-	+14 bp
<i>G*0101g†</i>	nd	nd	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*G3d5†</i>	nd	nd	---	---	---	--A	---	--T	--T	---	---	---	---	nd	nd	---	+14 bp

Fonte: HVIID, 2006.

Diversos estudos têm identificado variações nas sequências de DNA envolvendo regiões não codificantes, como 5'URR (região 5' reguladora a montante do promotor) e 3'UTR (região 3' não traduzida). Estes polimorfismos parecem ter importância na regulação da expressão do *HLA-G*, porém a ligação funcional e importância deles permanecem incertas, podendo desempenhar papel importante nas complicações da gravidez. A constatação de que determinados alelos do *HLA-G*, apesar de não apresentarem divergência quanto à composição de aminoácidos que codificam, podem estar correlacionados com diferentes níveis plasmáticos de

proteínas HLA-G funcionais, possibilitou estudos cujos objetivos eram o de avaliar a relevância desta molécula nas complicações da gravidez (HVIID, 2006).

2.4.4. HLA-G e gestação

Não são poucas as evidências que sugerem que a modulação da expressão das moléculas *HLA-G* pode ser uma condição fundamental para uma gestação bem sucedida, que está, em parte, associada à expressão de níveis elevados da molécula de *HLA-G* solúvel (sHLA-G) (VINGANO *et al.*, 2003). O *HLA-G* exerce um papel chave na implantação, através da modulação da secreção de citocinas para controlar a invasão das células trofoblásticas e para manter o estado de imunossupressão local. A interação entre as formas solúveis do *HLA-G* (sHLA-G) secretadas pelo trofoblasto e linfócitos uterinos, seria fundamental na indução da imunotolerância para a invasão do blastocisto no endométrio materno (ROUSSEV & COULAM, 2007).

O nível de *HLA-G* solúvel parece modular o perfil materno de citocinas. Em casos onde os níveis de sHLA-G são baixos, há uma relação com citocinas de perfil inflamatório Th1: IL2, TNF- α e IFN- γ , enquanto que altos níveis de sHLA-G parecem estar associados ao perfil Th2 de citocinas anti-inflamatórias: IL-4, IL-5 e IL10. As moléculas de sHLA-G também poderiam ter uma função na regulação da angiogênese placentária ou poderiam agir como imunossupressores durante a gestação (LE BOUTEILLER, LEGRAND-ABRAVANEL & SOLIER, 2003).

Também foi observado que no tecido placentário, a expressão acentuada do *HLA-G* é inversa à expressão das moléculas classe Ia (Clássicas) e de classe II, podendo ser considerada quase insignificante a expressão das moléculas de classe I clássicas e de classe II. Esta característica parece ser importante para o mecanismo de tolerância imunológica materno-fetal (GOBIN *et al.*, 1999; VAN DER VEN, PFEIFFER & SKRABLIN, 2000; LE BOUTEILLER, LEGRAND-ABRAVANEL & SOLIER, 2003). A exclusiva expressão paterna do *HLA-G* pelo feto, em combinação com o menor número de alelos é postulada como pré-requisito para a modulação da resposta imune materna na gestação (VAN DER VEN *et al.*, 1998).

O *HLA-G* geralmente não é expresso em adultos não gestantes, podendo ser um marcador adequado para o diagnóstico e monitoramento da gestação. As

moléculas sHLA-G circulam no sangue materno durante a gestação. Isso tem mostrado que mulheres com baixos níveis pré-ovulatórios de sHLA-G parecem ter um risco aumentado de aborto pós-FIV. Além disso, os níveis de sHLA-G no sangue materno são indicativos do vigor da invasão do citotrofoblasto e são correspondentes da “saúde” da interface materno-fetal (ROUSSEV & COULAM, 2007).

Rebmann e colaboradores, em 2001, realizaram um estudo de associação entre alelos do *HLA-G* e níveis séricos de sHLA-G, demonstrando a existência de associação entre os mesmos, evidenciando o controle genético sobre os níveis de sHLA-G (Tabela 3) (REBMANN *et al.*, 2001).

TABELA 3. Associação de alelos do *HLA-G* com níveis de sHLA-G

Association of HLA-G alleles with sHLA-G and sHLA-I levels

HLA-G*	n ¹	sHLA-G (ng/ml)				sHLA-I (ng/ml)			
		mean	SEM	t-test	P _c	mean	SEM	t-test	P _c
01011	66	27.0	2.1			573.0	53.4		
01012	34	28.4	3.2			659.4	93.4		
01013	17	8.1	1.7	<0.0001	<0.001	666.0	106.9		
01018	6	26.6	3.9			733.2	252.6		
0101g	1	49.9				1082.0			
01031	7	31.3	6.3			733.0	191.2		
01041	14	42.5	4.6	0.0004	0.0036	1345.0	195.0	<0.0001	<0.001
0104b	4	29.5	7.9			831.3	145.0		
0105N	7	8.2	3.2	0.0013	0.012	813.6	271.1		

¹ Frequencies of individual HLA-G alleles from homozygous or heterozygous probands. None of the individuals tested was homozygous for the HLA-G*01013, G*0101g, G*01031, G*01041, G*0104b, and G*0105N alleles, respectively.

Além disso, a molécula sHLA-G demonstra ser promissora na identificação e seleção de embriões na TRA, cujo resultado seria o aumento na taxa de sucesso na gravidez. Em diversos estudos, onde os níveis de sHLA-G foram quantificados em sobrenadantes de embriões de FIV, foi demonstrado que a presença dessas moléculas, no meio de cultivo dos embriões selecionados para transferência, auxiliava a manutenção da gestação após o sucesso implantacional, enquanto que sua ausência favorecia a perda fetal (FUZZI *et al.*, 2002; SHER *et al.*, 2005; REBMANN *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Por meio de um estudo caso-controle, investigar a associação entre falha de implantação embrionária e a variabilidade genética dos exons 2, 3 e 4 do gene *HLA-G* e o nível sérico de sHLA-G.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar as frequências alélicas do *HLA-G* observadas no grupo com falha de implantação e no grupo controle.
- Comparar as frequências genotípicas do *HLA-G* observadas no grupo com falha de implantação e no grupo controle.
- Comparar as frequências dos portadores de alelos do *HLA-G* observadas no grupo com falha de implantação e no grupo controle.
- Quantificar o nível sérico de sHLA-G no grupo com falha de implantação e no grupo controle, comparando-os.
- Investigar associação entre as variáveis analisadas e a falha de implantação.

4. JUSTIFICATIVA

A linha de pesquisa em Imunologia da Reprodução constitui um capítulo adjuvante na compreensão e tentativa de resolução de casos de insucesso reprodutivo e casos obstétricos complexos, podendo oferecer investigação, diagnóstico e terapia específicos que, em última análise, complementariam a rotina reprodutiva.

Acreditamos que a possível associação entre o gene *HLA-G* e seus níveis séricos solúveis com falha de implantação embrionária poderia auxiliar na identificação e monitoramento de complicações gestacionais específicas, funcionando como um possível marcador prognóstico, ou como complemento de terapias que visam o sucesso implantacional.

Neste contexto, é de extrema importância o conhecimento do impacto da diversidade genética e suas implicações em situações de falha de implantação embrionária. Estudos imunológicos, juntamente com métodos moleculares, podem proporcionar melhor reprodutibilidade, fidedignidade e precisão, além de permitir aos pesquisadores averiguar como a expressão de determinados genes podem afetar o processo gestacional.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados na forma de um artigo científico que está formatado de acordo com as normas da revista Fertility & Sterility (<http://www.fertstert.org/authorinfo>).

Running Title: HLA-G in couples with implantation failure

Analysis of *HLA-G* polymorphisms and soluble serum *HLA-G* in couples with implantation failure

Fabiola da Silva Nardi¹; Renata Slowik¹; Pryscilla Fanini Wowk¹; José Samuel da Silva¹; Geórgia Fernanda Gelmini¹; Tatiana Ferreira Michelin², Jorge Neumann²; Maria da Graça Bicalho¹

¹ Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brasil

² Centro de Imunologia da Reprodução (CIR), Porto Alegre (RS), Brasil

Correspondence to Prof. Maria da Graça Bicalho

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade,

Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná

R. Cel. Francisco H. dos Santos S/N

Centro Politécnico – Jardim das Américas

CP 19071, CEP 81.530.990, Curitiba –PR, Brazil

Tel: +55 41 3361 1729, Fax: +55 41 3266 2042

e-mail: ligh@ufpr.br

CAPSULE

The results of an analysis of *HLA-G* polymorphisms in couples with implantation failure suggests that the *G*01:03:01* allele may be a possible risk factor for embryo implantation, emphasizing that maternal acceptance is under genetic control.

ABSTRACT

Objective: To investigate the association between the genetic variability of exons 2, 3 and 4 of the *HLA-G* gene and serum levels of soluble HLA-G in cases of embryo implantation failure.

Design: Case-control study.

Setting: University research center.

Patient(s): The patient group comprises forty unrelated couples and one woman with at least two unsuccessful fresh embryo transfers (implantation failure; IF), and the control group comprises eighty-three unrelated fertile couples and one man with at least two successful pregnancies without history of miscarriages or other reproductive problems.

Intervention(s): The *HLA-G* gene was genotyped by direct DNA sequencing. *HLA-G* alleles were defined by nucleotide sequence variations at exon 2, 3 and 4, and the quantification of soluble HLA-G (sHLA-G) was performed by ELISA.

Main Outcome Measure(s): The calculation of *HLA-G* allelic frequencies and genotype distributions and the determination of serum levels of sHLA-G.

Results: There was a significant difference between the *HLA-G* allelic distributions between IF couples and the control couples. The *HLA-G*01:03:01* allele was observed in 22.22% of the IF couples and in 5.98% of the fertile couples ($p=0.0004$; $p_c=0.006$; $OR=4.486$; $1.963 \leq 95\%CI \leq 10.25$). There were no significant differences in the serum levels of sHLA-G in the IF and control groups.

Conclusions: The results suggest that the distribution of HLA-G products may play a significant role in the modulation of maternal-fetal immune response.

Keywords: assisted reproduction treatment, *HLA-G*; soluble HLA-G, implantation failure.

INTRODUCTION

Assisted Reproduction Techniques (ART), such as conventional IVF (*in vitro* fertilization) and ICSI (intracytoplasmic sperm injection) have improved the childbearing rates of couples with infertility diagnoses. Advances in this area have been significant since its inception in 1978, with current success rates reaching 20 – 30% (1-4). The failure rate observed in these procedures is directly related to the lack of knowledge regarding the numerous pathophysiological aspects of embryo implantation. This complex process depends, among other factors, on the triggering of an appropriate response from the cells of two immunogenically distinct organisms. The arrival of the blastocyst in the uterine cavity promotes functional and molecular changes in endometrial cells and in the blastocyst itself, resulting in adhesion, trophoblast invasion, decidualization and placentation (5-7).

Implantation failures after repeated ART procedures can be attributed to decreased endometrial receptivity, embryonic defects or a combination of both (8, 9). Moreover, deficits in placentation or defects in trophoblast invasion and/or angiogenesis, which are mechanisms dependent on the maternal-fetal interaction, are also causes of early fetal loss (10).

One of the central issues for a successful pregnancy is the prevention of maternal immune rejection (11). The (human leukocyte antigen – G) *HLA-G* represents a key gene in embryo implantation, acting to modulate the local immune response, thereby suppressing an attack of the fetus by the maternal immune system. This suppression is accomplished by affecting maternal cytokine secretion to control the invasion by trophoblastic cells (12)

HLA-G is a non-classical class I human leukocyte antigen that has a similar structure to classical HLA Ia but with a less polymorphic gene and an expression restricted to several specific healthy adult tissues such as the thymus, cornea, pancreas and the proximal nail matrix (13, 14). The *HLA-G* gene transcribes an mRNA that is processed in different ways, resulting in one of its most striking features, its seven protein isoforms. Four of these isoforms

are membrane-bound (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 and HLA-G4) proteins, and three isoforms are soluble proteins (sHLA-G) that do not contain membrane-anchoring regions (HLA-G5, HLA-G6 and HLA -G7) (15, 16). Functional studies have revealed that both the soluble and membrane-anchored HLA-G molecules can bind to three inhibitory receptors (ILT2, ILT4 and KIR2DL4), inhibiting the effector function of T cells and natural killer (NK) cells (13, 17).

The discovery of *HLA-G* in cytotrophoblast cells provided new perspectives concerning the understanding of how the maternal immune system recognizes the fetal allograft, especially considering the soluble isoforms of this protein, which may partly explain peripheral maternal immunostimulation and immunosuppression during pregnancy (18).

Therefore, it is possible that changes in the modulation of the immune response may comprise at least one of the factors involved in the failure rate of ART procedures. Therefore, difficulties in triggering an appropriate response to allogeneic stimulation, here represented by the embryo, may constitute a cause of implantation failure. (19, 20). To test this hypothesis, we investigated the genotypes of the *HLA-G* gene, sHLA-G serum levels and their association in cases of implantation failure and in comparable controls.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

EDTA blood samples were collected from one hundred twenty-four couples, predominantly Euro-Brazilians, who were divided into two groups. The patient group consisted of forty unrelated couples and one woman with at least two unsuccessful fresh embryo transfers (IF), all referred from the Centro de Imunologia da Reprodução, Porto Alegre, RS. The control group was comprised of eighty-three randomly selected unrelated fertile couples and one man with at least two successful pregnancies (CTL), all belonging to

Curitiba, PR. None of the couples from the control group experienced fertility problems or recurrent spontaneous abortion (RSA).

Serum samples from one hundred and one women were taken for analysis by ELISA, including forty-one IF women and sixty CTL women. The Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the UFPR (HC-UFPR) approved the study (CEP-HC n°037ext.019/2001-07), and all patients and controls signed an informed consent form and an occupational questionnaire.

sHLA-G concentration in peripheral blood

The sHLA-G level in serum was determined using a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (EXBIO/BioVendor, Praha, Czech Republic). Standard and sample sera were added to microplate wells previously coated with the mouse monoclonal antibody MEM-G/9, which recognizes the most abundant soluble isoforms: HLA-G1 and the intron4-containing secreted HLA-G5. The immobilized antibody/sHLA-G complex was detected with mouse monoclonal anti-human beta2-microglobulin antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP). The reaction was stopped after 35 minutes of incubation, and the absorbance was measured at the wavelength $\lambda = 450$ nm on an ELX-800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). A standard curve was used to establish the protein concentrations in the analyzed samples. The analytical sensitivity was 3.9 U/ml.

HLA-G typing

Genomic DNA was isolated from peripheral blood using a salting-out procedure as previously described (21). The *HLA-G* alleles were defined by DNA sequence variations in exon 2, 3 and 4 by sequence-based typing. DNA amplification was performed using polymerase chain reaction (PCR) resulting in products of 588, 456 and 364 base pairs, respectively, using the following sets of primers: exon 2 (5': GGGTCGGGCGGGTCTCAA

and 3': TCCGTGGGGCATGGAGGT), exon 3 (5': CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG and 3': CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA) and exon 4 (5': CCATGAGAGA TGCA AAGTGCT and 3': TGCTTTCCCTAACAGACATGAT).

PCR conditions for exons 2, 3 and 4 were as follows: 60 ng of genomic DNA was amplified in a final reaction volume of 50 μ l containing 1X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 20 pmol of each primer and 2.25 units of Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The thermocycling conditions were as follows: the initial denaturation was 94°C for 5 min, and the final extension step was 72°C for 5 min for all reactions; Exon 2: 35 cycles of 94°C for 30 s, 66°C for 30 s and 72°C for 2 min; Exon 3: 35 cycles of 94°C for 30 s, 70°C for 30 s and 72°C for 2 min; Exon 4: 35 cycles of 94°C for 30 s, 62°C for 30 s and 72°C for 2 min.

The PCR products were directly DNA sequenced using the ABI Prism Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) and an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). The primers used in the direct DNA sequencing were the same as those in the PCR amplification. The alleles were identified by alignment with the genomic sequences of the official alleles listed in the International Immunogenetics Information System – IMGT), and each single nucleotide polymorphism detected was individually noted.

Statistical analysis

The *HLA-G* allele frequencies and *HLA-G* genotypes of the women and men in the IF and control groups were calculated by direct counting and were compared with their Hardy-Weinberg equilibrium values using the Arlequin 3.0 software (22) using χ^2 tests (23). The comparison of allele frequencies and genotypes between the two groups was performed using the χ^2 test and Fisher's exact test, as appropriate, using the InStat 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Consolidated sHLA-G data are presented as the median after determining the Gaussian distribution. The serum levels for the two groups and for each allele were compared by the Mann-Whitney Test.

The corresponding p -values were corrected (p_c) for the number of *HLA-G* alleles and genotypes tested in this study population.

RESULTS

The mean age of the female patients was 31.6 ± 5.6 , and the average number of previous ART procedures was 3.6 ± 1.97 . The mean number of embryos transferred in each previous cycle was 3 ± 0.58 . The average period of attempted pregnancy was 6.12 ± 3.59 years. The average age of the male patients was 41.9 ± 6.0 . The mean age of controls was 44.2 ± 11.7 for females and 47.2 ± 12.2 for males. All couples had normal karyotypes, and patients with endometriosis and polycystic ovary syndrome were excluded from the analysis.

All the couples in the IF and control groups were successfully sequenced for exons 2, 3 and 4 of the *HLA-G* gene. However, quantification of sHLA-G in serum was successfully performed in only 39 of the 101 total women in both groups (IF = 21, CTL = 18). Women with sHLA-G levels outside of the detection limits (3.9 U/ml) were excluded from the analysis (IF = 20, CTL = 42).

HLA-G allelic frequencies

Fifteen different *HLA-G* alleles were observed in our study. The distributions of the alleles are shown and compared between the patient and control groups in Table 1. There was a significant difference between the allelic distributions of *HLA-G* in couples with implantation failure and fertile couples. The frequency of the *HLA-G*01:03:01* allele was significantly increased in couples with implantation failure (11.11%) relative to fertile couples

(3.29%, $p = 0.0011$; $p_c = 0.0165$; OR = 3.670; $1.690 \leq 95\%CI \leq 7.972$). In addition, comparisons between groups according to sex revealed no statistically significant differences after p -value correction.

HLA-G genotype frequencies

There were no significant differences after p -value correction for any genotype when comparing women or men belonging to the IF group and women or men in the control group (data not shown). Thirty-two different genotypes of the *HLA-G* gene were found in our study population.

HLA-G allelic carriers

When we compared the carriers of the *HLA-G* alleles, we found that the *G*01:03:01* allele was significantly more common in couples in the IF group (22.22%) compared with the control group (5.98%) ($p = 0.0004$; $p_c = 0.006$; OR = 4.486; $1.963 \leq 95\%CI \leq 10.253$). In comparisons between the groups according to sex, no significant differences were observed after p -value correction. The frequency distribution of carrier alleles are listed and compared between the patients and the controls in Table 2.

sHLA-G serum levels versus HLA-G alleles

No significant differences were found when the serum levels of sHLA-G in the implantation failure and control groups were compared. The distribution of the serum levels of sHLA-G in the samples is shown in Figure 1. On evaluating the possible association between *HLA-G* alleles and sHLA-G serum levels, the patient and control groups were united by the fact that there was no statistically significant difference between them, and they can therefore be considered a single group. The median sHLA-G serum levels corresponding to the individual *HLA-G* alleles tested in this study are listed in Table 3. Four different alleles were tested for sHLA-G levels because these were the only alleles with

sufficient sample sizes for this analysis; after correction of the p -values, no significant differences were found.

DISCUSSION

Implantation failure in ART is a problem in many clinics and is the main reason for the turnover of clinical staff and for the abandonment of the program by patients, which increases with each successive cycle (24-27). Several immunological mechanisms have been investigated to elucidate the etiology of a large proportion of implantation failures (28-30). Currently, many studies are focused in the role of *HLA-G* polymorphisms and their sHLA-G isoforms in this context. Thus, the purpose of this study was to investigate the association between *HLA-G* gene polymorphisms and soluble HLA-G serum protein levels in cases of embryo implantation failure.

Regarding total allelic frequencies, our data show that the *HLA-G*01:03:01* allele was significantly more frequent in couples suffering from implantation failure ($p_c = 0.0165$) (Table 1). With respect to allele carriers, the *G*01:03:01* allele was also more common in IF couples ($p_c = 0.006$), with an OR value (4.486) suggesting that this allele is an important IF marker for these couples (Table 2). Comparisons between groups according to sex revealed no statistically significant differences after p -value correction. This study marks the first report of an association between the *G*01:03:01* allele and implantation failure.

Others associations were interesting, although no significance was found after p -value correction. The *G*01:01:01* allele frequency was increased in women in the control group (71.08%) compared with the IF women (53.65%, $p = 0.0859$; Table 2). A similar association was reported by Vargas *et al.* (31) in another Brazilian population study of recurrent miscarriage that described an increased frequency of *G*01:01A* (which includes the *G*01:01:01*, *G*01:01:02*, *G*01:01:03*, *G*01:01:04*, *G*01:01:05* and *G*01:01:06* alleles)

in control women with at least two successful pregnancies. This association was also found by our group in another Brazilian study (unpublished data) of patients undergoing assisted reproductive treatments, again describing an increased frequency of the *G*01:01:01* allele in control women, following the same inclusion criteria as used by Vargas *et al.* 2011. The frequency of *G*01:04:01* was increased in IF women (29.26%) compared with fertile women carrying this allele (12.04%, $p = 0.0347$; Table 2). This association was similar to that reported by Aldrich *et al.* (32), who found an increased frequency of the *G*01:04* allele in couples with unexplained recurrent miscarriage in Canada and the USA.

A study by Pfeiffer *et al.* (33) reported an increased frequency of the *G*01:01:03* and *G*01:05N* alleles in cases of recurrent miscarriage in a German population. In a study by Abbas *et al.* (30), the frequent occurrence of the *G*01:01:03* allele among women with recurrent spontaneous abortion (RSA) in a population from India was demonstrated. Aldrich *et al.* (32) reported no association of *G*01:01:03* with RSA; however, they reported the association of the null allele *G*01:05N* with recurrent miscarriages in a population from Canada and the USA.

We did not confirm these reports in our cases of implantation failure in Brazil. The discrepancy when comparing studies may be explained by the rarity of cases of implantation failure and recurrent spontaneous abortion, making it difficult to collect the large number of samples ideal for this type of association study. Another reason could be that embryo implantation failure is related not only to specific *HLA-G* allele variation but also to the interactions between these alleles and their ligands. Considering that *HLA-G* alleles and their ligands vary in frequency in different populations due to various evolutionary processes such as environmental pressure and genetic drift, the association of a specific allele with implantation failure in a population may be a result of both *HLA-G* and its ligand.

The *HLA-G* gene has been referred to as an important modulator of immunologic tolerance, as a result of the interactions between KIR2DL4 receptors and epitope ligands in the alpha helix of the HLA-G protein, which inhibit the cytotoxic activity mediated by NK cells. The interaction between maternal NK cells and trophoblastic cells can impact embryo implantation (7). The *HLA-G* gene is expressed in trophoblastic cells so that the interaction between HLA proteins of fetal origin and maternal NK cell receptors creates a balance of signals between activating and inhibitory receptors, thus limiting the cytotoxic action of the NK cells (34). An alternative explanation for the allelic specificity related to implantation failure may be that allelic variants of *HLA-G* act differently in the interaction between receptors and ligands on the target cell depending on differences in their amino acid compositions and three-dimensional structures, so several specific alleles may influence implantation failure. Figure 2 shows a schematic representation of this hypothesis.

Regarding sHLA-G levels, the majority of women had sHLA-G levels below the detection limit of the kit ($n = 62$); however, a minority had detectable levels of sHLA-G ($n = 39$). One explanation for this finding is the relatively high threshold detection limit of the test protocol; women who had levels of sHLA-G lower than 3.9 U/ml (61.39%), detection limit of the kit were not included. Moreover, we found no association of soluble HLA-G serum levels with *HLA-G* alleles, as found in a prior study by Rebmann *et al.* (35), who reported that the presence of the *G*01:01:03* and *G*01:05N* alleles resulted in significantly lower levels of sHLA-G in plasma, whereas the *G*01:04:01* allele resulted in significantly higher plasma levels of sHLA-G.

Considering that CTL serum levels did not represent a pregnancy status, as expected, there was no difference between the sHLA-G levels in the two groups. This finding shows that implantation failure follows the same pattern in non-pregnant fertile women, emphasizing our observation that the majority of women were actually below the 3.9 U/ml

detection limit and confirming the fact that IF women exhibit a pattern similar to non-pregnant women with very low levels of sHLA-G (13).

An interesting observation of our study, although not statistically significant, was that the median level of sHLA-G in women belonging to the group with implantation failure (22.41 U/ml) was lower than the median level of sHLA-G in women belonging to the control group (45.24 U/ml). A study by Pfeiffer *et al.* (36) reported that women with ART failure presented lower sHLA-G levels in the pre-ovulation period and during pregnancy than women with normal pregnancy. These levels of sHLA-G may be even lower than the levels of the fertile controls, so these women cannot achieve the levels appropriate for a pregnancy without incident; however, to confirm this hypothesis, we must increase our sample size or use a more sensitive method of analysis to determine the levels of sHLA-G that were not detectable by ELISA (i.e., in 61.39% of the women tested). The detectable levels of sHLA-G observed in several samples may result from physiological conditions in which sHLA-G is expressed by erythroid precursors, endothelial precursors and mesenchymal stem cells in adults (37-39) or may be due to a variety of disorders such as autoimmune diseases, infectious diseases, inflammatory diseases, tumors and transplantation (39-41), which were not used as exclusion criteria.

In conclusion, our results suggest that the presence of the *G*01:03:01* allele is a possible risk factor for embryo implantation failure, in addition to several other factors involved in this immunoregulatory network. This finding emphasizes that embryo implantation is under genetic control and confirms the hypothesis that *HLA-G* products play an important role in the modulation of the maternal-fetal immune response.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by research funding from FUNPAR-LIGH and CAPES. We would like to thank the couples for generously providing samples for this study. We are most grateful to the Centro de Imunologia da Reprodução and LIGH staff for their technical support.

REFERENCES

1. Kling C, Schmutzler A, Wilke G, Hedderich J and Kabelitz D. Two-year outcome after recurrent implantation failure: prognostic factors and additional interventions. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 278:135-42.
2. Allen VM, Wilson RD and Cheung A. Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology. *J Obstet Gynaecol Can* 2006; 28:220-50.
3. Myers ER, McCrory DC, Mills AA, Price TM, Swamy GK, Tantibhedhyangkul J, *et al.* Effectiveness of assisted reproductive technology (ART). *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 2008; 1-195.
4. Pauli SA, Berga SL, Shang W and Session DR. Current status of the approach to assisted reproduction. *Pediatr Clin North Am* 2009; 56:467-88, Table of Contents.
5. Urman B, Yakin K and Balaban B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. A. General considerations and treatment options that may benefit the couple. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:371-81.
6. Senturk LM and Erel CT. Thin endometrium in assisted reproductive technology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20:221-8.
7. Rizzo R, Vercammen M, van de Velde H, Horn PA and Rebmann V. The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68:341-52.
8. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M and Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 2006; 21:3036-43.
9. Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2011; 96:522-9.
10. Carver J, Martin K, Spyropoulou I, Barlow D, Sargent I and Mardon H. An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. *Hum Reprod* 2003; 18:283-90.
11. Roussev RG and Coulam CB. HLA-G and its role in implantation (review). *J Assist Reprod Genet* 2007; 24:288-95.
12. Puppo F, Ghio M, Contini P, Brenzi S, Bignardi D, Filaci G, *et al.* Immunoregulatory role of soluble HLA molecules: a new skin for an old subject? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1998; 46:157-60.
13. Alegre E, Diaz-Lagares A, Lemaoult J, Lopez-Moratalla N, Carosella ED and Gonzalez A. Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. *Hum Immunol* 2007; 68:661-7.
14. Moreau P, Flajollet S and Carosella ED. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med* 2009; 13:2973-89.
15. Vercammen M, Verloes A, Haentjens P and Van de Velde H. Can soluble human leucocyte antigen-G predict successful pregnancy in assisted reproductive technology? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21:285-90.

16. Hunt JS, Pace JL, Morales PJ and Ober C. Immunogenicity of the soluble isoforms of HLA-G. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:729-35.
17. Rebmann V, LeMaout J, Rouas-Freiss N, Carosella ED and Grosse-Wilde H. Quantification and identification of soluble HLA-G isoforms. *Tissue Antigens* 2007; 69 Suppl 1:143-9.
18. Athanassakis I, Pafliis M, Ranella A and Vassiliadis S. Detection of soluble HLA-G levels in maternal serum can be predictive for a successful pregnancy. *Transplant Proc* 1999; 31:1834-7.
19. Ghazeeri GS and Kutteh WH. Immunological testing and treatment in reproduction: frequency assessment of practice patterns at assisted reproduction clinics in the USA and Australia. *Hum Reprod* 2001; 16:2130-5.
20. Schieve LA, Tatham L, Peterson HB, Toner J and Jeng G. Spontaneous abortion among pregnancies conceived using assisted reproductive technology in the United States. *Obstet Gynecol* 2003; 101:959-67.
21. Lahiri DK and Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:5444.
22. Excoffier L, Laval G and Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005; 1:47-50.
23. Guo SW and Thompson EA. A Monte Carlo method for combined segregation and linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1992; 51:1111-26.
24. Osmanagaoglu K, Tournaye H, Camus M, Vandervorst M, Van Steirteghem A and Devroey P. Cumulative delivery rates after intracytoplasmic sperm injection: 5 year follow-up of 498 patients. *Hum Reprod* 1999; 14:2651-5.
25. Sharma V, Allgar V and Rajkhowa M. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility. *Fertil Steril* 2002; 78:40-6.
26. Witsenburg C, Dieben S, Van der Westerlaken L, Verburg H and Naaktgeboren N. Cumulative live birth rates in cohorts of patients treated with in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2005; 84:99-107.
27. Schroder AK, Katalinic A, Diedrich K and Ludwig M. Cumulative pregnancy rates and drop-out rates in a German IVF programme: 4102 cycles in 2130 patients. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:600-6.
28. Christiansen OB, Ring M, Rosgaard A, Grunnet N and Gluud C. Association between HLA-DR1 and -DR3 antigens and unexplained repeated miscarriage. *Hum Reprod Update* 1999; 5:249-55.
29. Ober C, Hyslop T, Elias S, Weitkamp LR and Hauck WW. Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10 year prospective study. *Hum Reprod* 1998; 13:33-8.
30. Abbas A, Tripathi P, Naik S and Agrawal S. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Immunogenet* 2004; 31:275-8.
31. Vargas RG, Sarturi PR, Mattar SB, Bompeixe EP, Silva Jdos S, Pirri A, *et al.* Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14 bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples. *Hum Immunol* 2011; 72:479-85.
32. Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, *et al.* HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:1167-72.
33. Pfeiffer KA, Fimmers R, Engels G, van der Ven H and van der Ven K. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:373-8.
34. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:225-74.

35. Pfeiffer KA, Rebmann V, Passler M, van der Ven K, van der Ven H, Krebs D, *et al.* Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol* 2000; 61:559-64.
36. Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P and Lemaoult J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 2008; 111:4862-70.
37. Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J and Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 2008; 29:125-32.
38. Carosella ED. The tolerogenic molecule HLA-G. *Immunol Lett* 2011; 138:22-4.
39. Pistoia V, Morandi F, Wang X and Ferrone S. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol* 2007; 17:469-79.
40. Fainardi E, Castellazzi M, Stignani M, Morandi F, Sana G, Gonzalez R, *et al.* Emerging topics and new perspectives on HLA-G. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68:433-51.
41. Rebmann V, van der Ven K, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D and Grosse-Wilde H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 2001; 57:15-21.

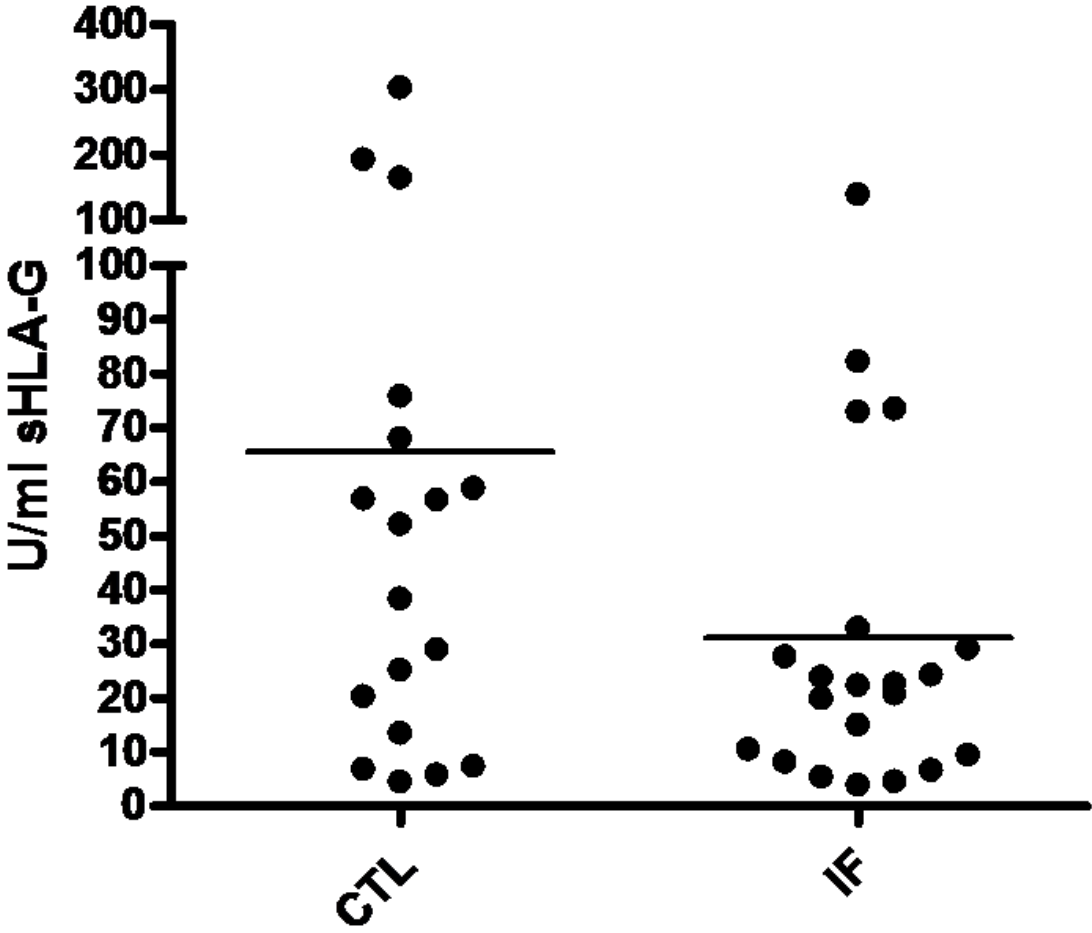
Figure 1. Distributions of serum sHLA-G levels in the IF group and the control group.

sHLA-G quantification was performed in 39 women from both groups (IF = 21, CTL = 18).

Women with sHLA-G levels below the detection limit (3.9 U/ml) were excluded from the analysis.

Figure 2. Hypothesis explaining the role of the *G*01:03:01* allele in the regulation of the

embryo implantation process. The connection between the specific allele *G*01:03:01* and its inhibitory receptor may not be sufficient, or may not occur at all, due to several differences in their amino acid compositions or three-dimensional structures, triggering an imbalance of signals between the activating and inhibitory receptors, activating the cytotoxic action of the natural killer cells, which may lead to implantation failure.



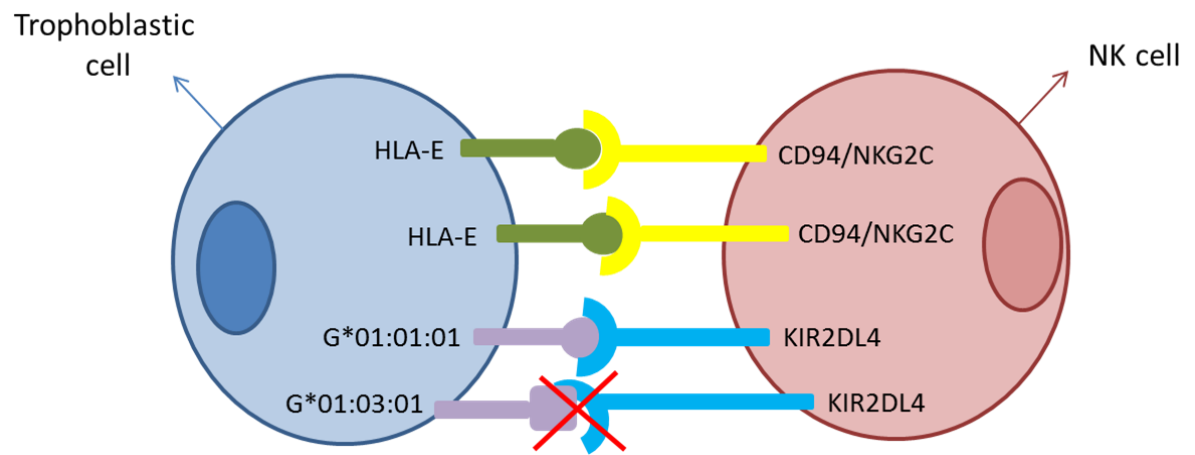


Table 1. Comparison of *HLA-G* allelic frequencies

		<u>Patients</u>	<u>Controls</u>	<i>p-value</i> ^a	<i>p_c value</i>
Alleles		(2n=162)	(2n=334)		
		n (%)	n (%)		
<i>Couples</i>	<i>HLA-G*01:01:01</i>	63 (38.89)	142 (42.51)	0.5017	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:02</i>	35 (21.60)	85 (25.45)	0.4089	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:03</i>	03 (1.85)	19 (5.69)	0.0865	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:06</i>	01 (0.06)	00 (0.00)	0.7113	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:07</i>	00 (0.00)	01 (0.03)	0.7113	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:08</i>	12 (7.40)	31 (9.28)	0.5993	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:12</i>	01 (0.06)	00 (0.00)	0.7113	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:14</i>	01 (0.06)	00 (0.00)	0.7113	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:20</i>	01 (0.06)	00 (0.00)	0.7113	1.0000
	<i>HLA-G*01:03:01</i>	18 (11.11)	11 (3.29)	0.0011	0.0165^b
	<i>HLA-G*01:04:01</i>	18 (11.11)	30 (8.98)	0.5555	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:03</i>	01 (0.06)	01 (0.03)	0.5470	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:04</i>	02 (1.23)	01 (0.03)	0.2644	1.0000
	<i>HLA-G*01:06</i>	05 (3.08)	09 (2.70)	0.7790	1.0000
	<i>HLA-G*01:05N</i>	03 (1.85)	02 (0.06)	0.3361	1.0000
		<u>Female</u>	<u>Female</u>	<i>p-value</i> ^a	<i>p_c value</i>
Alleles		Patients (2n=82)	Controls (2n=166)		
		n (%)	n (%)		

<i>Females</i>	<i>HLA-G*01:01:01</i>	30 (36.58)	81 (48.80)	0.0923	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:02</i>	17 (20.73)	40 (24.10)	0.6657	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:03</i>	02 (2.44)	12 (7.23)	0.1523	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:06</i>	01 (1.22)	00 (0.00)	0.3306	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:08</i>	06 (7.32)	12 (7.23)	0.8142	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:14</i>	01 (1.22)	00 (0.00)	0.3306	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:20</i>	00 (0.00)	01 (0.06)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:03:01</i>	08 (9.75)	04 (2.41)	0.0226	0.2712
	<i>HLA-G*01:04:01</i>	12 (14.63)	10 (6.02)	0.0448	0.5376
	<i>HLA-G*01:04:04</i>	01 (1.22)	00 (0.00)	0.3306	1.0000
	<i>HLA-G*01:06</i>	02 (2.44)	05 (3.01)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:05N</i>	02 (2.44)	01 (0.06)	0.2548	1.0000
<hr/>					
		<u>Male</u>	<u>Male</u>		
	Alleles	Patients (2n=80)	Controls (2n=166)	<i>p-value</i>^a	<i>p_c value</i>
		n (%)	n (%)		
<i>Males</i>	<i>HLA-G*01:01:01</i>	33 (41.25)	61 (36.31)	0.5421	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:02</i>	18 (22.50)	19 (11.31)	0.5695	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:03</i>	01 (1.25)	07 (4.17)	0.4428	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:07</i>	00 (0.00)	01 (0.06)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:08</i>	06 (7.50)	19 (11.31)	0.8181	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:12</i>	00 (0.00)	01 (0.06)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:03:01</i>	10 (12.50)	07 (4.20)	0.0380	0.3696
	<i>HLA-G*01:04:01</i>	06 (7.50)	20 (11.90)	0.4027	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:03</i>	01 (1.25)	01 (0.06)	0.5420	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:04</i>	01 (1.25)	01 (0.06)	0.5420	1.0000

<i>HLA-G*01:06</i>	03 (3.75)	04 (2.38)	0.6843	1.0000
<i>HLA-G*01:05N</i>	01 (1.25)	01 (0.06)	0.5420	1.0000

CI: confidence interval; *P_c*: *p*-value after correction by multiplying the number of alleles compared; OR: odds ratio Values shown in boldface are statistically significantly different

^a χ^2 test and Fisher's exact test, as appropriated

^b OR = 3.670; 95%CI = 1.690 – 7.972

Table 2. Comparison of carriers *HLA-G* allelic frequencies

	Alleles	<u>Patients</u>	<u>Controls</u>	<i>p-value</i> ^b	<i>p_c value</i>
		(n=81)	(n=167)		
		n ^a (%)	n ^a (%)		
<i>Couples</i>	<i>HLA-G*01:01:01</i>	46 (56.79)	107 (64.07)	0.3336	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:02</i>	32 (39.50)	72 (43.11)	0.6871	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:03</i>	03.(3.70)	18 (10.77)	0.1023	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:06</i>	01 (1.23)	00 (0.00)	0.3266	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:07</i>	00 (0.00)	01 (0.06)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:08</i>	12. (14.81)	28 (16.76)	0.8359	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:12</i>	00 (0.00)	01 (0.06)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:14</i>	01 (1.23)	00 (0.00)	0.3266	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:20</i>	01 (0.06)	00 (0.00)	0.7113	1.0000
	<i>HLA-G*01:03:01</i>	18 (22.22)	10 (5.98)	0.0004	0.0060^c
	<i>HLA-G*01:04:01</i>	18 (22.22)	30 (17.96)	0.7206	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:03</i>	01 (1.23)	01 (0.06)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:04</i>	02 (2.46)	01 (0.06)	0.2494	1.0000
	<i>HLA-G*01:06</i>	05 (6.17)	08 (4.79)	0.7626	1.0000
	<i>HLA-G*01:05N</i>	03 (3.70)	02 (1.19)	0.3337	1.0000
	Alleles	<u>Female</u>	<u>Female</u>	<i>p-value</i> ^b	<i>p_c value</i>
		Patients(n=41)	Controls(n=83)		
		n ^a (%)	n ^a (%)		

Females	<i>HLA-G*01:01:01</i>	22 (53.65)	59 (71.08)	0.0859	1.0308
	<i>HLA-G*01:01:02</i>	17 (41.46)	35 (42.16)	0.9056	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:03</i>	02.(4.87)	11 (13.25)	0.2169	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:06</i>	01 (2.43)	00 (0.00)	0.3306	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:08</i>	06 (14.63)	12 (14.45)	0.8067	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:14</i>	01 (2.43)	00 (0.00)	0.3306	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:20</i>	00 (0.00)	01 (1.20)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:03:01</i>	08 (19.51)	04 (4.81)	0.0194	0.2328
	<i>HLA-G*01:04:01</i>	12 (29.26)	10 (12.04)	0.0347	0.4164
	<i>HLA-G*01:04:04</i>	01 (2.43)	00 (0.00)	0.3306	1.0000
	<i>HLA-G*01:06</i>	02 (4.87)	05 (6.02)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:05N</i>	02 (4.87)	01 (1.20)	0.2538	1.0000
	Alleles	<u>Male</u>	<u>Male</u>	<i>p</i>-value^b	<i>p_c</i> value
		Patients(n=40)	Controls(n=84)		
		n^a (%)	n^a.(%)		
Males	<i>HLA-G*01:01:01</i>	24 (60.00)	48 (57.14)	0.9150	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:02</i>	15 (37.50)	37 (44.04)	0.6199	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:03</i>	01.(2.50)	07 (8.33)	0.2748	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:07</i>	00 (0.00)	01 (1.19)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:08</i>	06. (15.00)	16 (19.04)	0.7641	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:12</i>	00 (0.00)	01 (1.19)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:03:01</i>	10 (25.00)	06 (7.14)	0.0091	0.1092
	<i>HLA-G*01:04:01</i>	06 (15.00)	20 (23.80)	0.3732	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:03</i>	01 (2.50)	01 (1.19)	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:04</i>	01 (2.50)	01 (1.19)	1.0000	1.0000

<i>HLA-G*01:06</i>	03 (7.50)	04 (4.76)	0.6799	1.0000
<i>HLA-G*01:05N</i>	01 (2.50)	01 (1.19)	1.0000	1.0000

CI: confidence interval; *Pc*: *p*-value after correction by multiplying the number of alleles compared; OR: odds ratio Values shown in boldface are statistically significantly different

^aAbsolute number of individual *HLA-G* alleles from homozygous or heterozygous samples

^b χ^2 test and Fisher's exact test, as appropriated

^cOR = 4.486; 95%CI = 1.963 – 10.253

Table 3. Association of *HLA-G* alleles with serum levels of sHLA-G.

Alleles	n ¹	<u>sHLA-G (U/ml)</u>	Mann-Whitney	<i>p_c</i> value
		Median	Test (<i>p-value</i>)	
<i>HLA-G*01:01:01</i>	28	27,06; P ₂₅ =12.75; P ₇₅ = 61.15	0,6159	1.0000
<i>HLA-G*01:01:02</i>	15	23,86; P ₂₅ =6.76; P ₇₅ = 47.59	0,3079	1.0000
<i>HLA-G*01:04:01</i>	10	23,13; P ₂₅ =12.09; P ₇₅ = 73.33	0,9502	1.0000
<i>HLA-G*01:03:01</i>	05	32,89; P ₂₅ =22.66; P ₇₅ = 138.52	0,3575	1.0000

¹Absolute number of individual *HLA-G* alleles from homozygous or heterozygous samples

6. CONCLUSÕES

- Os resultados deste estudo apresentam a possibilidade de o alelo *G*01:03:01* estar agindo como fator associado ao processo de falha de implantação;
- Em relação aos níveis séricos de sHLA-G, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo com falha de implantação e o grupo controle, mostrando que o padrão de expressão é o mesmo em ambos os grupos.
- A investigação da possível associação entre os níveis séricos de sHLA-G e os diferentes alelos encontrados na população de estudo não revelou diferença estatisticamente significativa, indicando a necessidade de um número amostral maior para esta análise em questão, sugerindo também a necessidade da utilização de um método de quantificação mais sensível;
- Os dados indicam que o sucesso no evento de implantação embrionária está sob controle genético, além de diversos outros fatores relacionados;
- Este trabalho destaca a necessidade e a perspectiva de estudos futuros com o intuito de complementar e corroborar os resultados apresentados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<http://www.embic.org>, acessado em 09/08/2011.

<http://www.redlara.com> acessado em 12/11/2011.

<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html> acessado em 06/12/2011.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**, 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 486p.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**.6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

AGRAWAL S.; PANDEY M.K. The potential role of *HLA-G* polymorfism in maternal tolerance to the developing fetus. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**. v. 12, p. 749-756, 2003.

ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.;WALTER P. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1462p.

AYRES, M.; AYRES, M.JR; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. Bioestat – Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências da Saúde. Belém, 2005.

BAINBRIDGE, D.; ELLIS, S.; LE BOUTEILLER, P.; SARGENT, I. *HLA-G* remains a mystery. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 10, 2001.

BELL, J. Chromosome crawling in the MHC, **Trends in Genetics**, v..5, n. 9, p. 289-290, 1989.

CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N.; PAUL, P.; DAUSSET, J. *HLA-G*: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. **Immunology Today**, v. 20, n. 2, p. 60-62, 1999.

CAROSELLA, E.D.; HOWANGYIN, K.Y.; FAVIER, B.; LE MAOULT, J. *HLA-G* dependent suppressor cells: diverse by nature, function and significance. **Human Immunology**, v. 69, p. 700-707, 2008-a.

CAROSELLA, E.D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory *HLA-G* molecule. **Blood**, v.111, p. 4862-4870, 2008-b.

CURI, PR. Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas. Ed Tipomic. 2ª edição, 1998.

DICKEY RP. The relative contribution of assisted reproductive technologies and ovulation induction to multiple births in the United States 5 years after the Society for Assisted Reproductive Technology/American Society for Reproductive Medicine recommendation to limit the number of embryos transferred. **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 6, p. 1554-1561, 2007.

DONADI E.A., CASTELLI E.C., ARNAIZ-VILLENA A., ROGER M., REY D., MOREAU P. Implications of the polymorphism of *HLA-G* on its function, regulation, evolution and disease association. **Cell Mol Life Sci**, v.68, p.369-395, 2011.

DUNHAN, I., SARGENT, C.A.; TROWSDADE, J.; CAMPBELL, R.D. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulse-field gel eletroforesis. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 84, p. 72-75, 1987.

EXCOFFIER, L; LAVAL, G. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolution Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FANCHIN, R.; GALLOT, V.; ROUAS-FREISS, N.; FRYDMAN, R.; CAROSELLA, E.D. Implication of *HLA-G* in human embryo implantation. **Human Immunology**, v. 68, p. 259-263, 2007.

FARR S.L.; SCHIEVE L.A.; JAMIESON D.J. Pregnancy loss among pregnancies conceived through Assisted reproductive Technology, United States, 1999-2002. **American Journal of Epidemiology**, v. 165 (12), p. 1380-1388, 2007.

FUZZI, B.; RIZZO, R.; CRISCUOLI, L.; NOCI, I.; MELCHIORRI, L.; SCARSELLI, B.; BENCINI, E.; MENICUCCI, A.; BARICORDI, O. *HLA-G* expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. **Europe Journal Immunology**, v. 32, p. 311-315, 2002.

GOBIN, S.J.P.; KEIJSERS, V.; CHEONG, C.; ZUTPHEN, M.; VAN DEN ELSEN, P.J. Transcriptional regulation of *HLA-G*. **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 1710-1716, 1999.

GOLDBERG, J.M.; FALCONE, T.; ATTARAN, M. In vitro fertilization update. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 74, n. 5, p. 329-338, 2007.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. A Monte Carlo method for combined segregation and linkage analysis. **The American Journal of Human Genetics**, v. 51, n. 5, p. 1111-1126, 1992.

HVIID T.V.F. *HLA-G* in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 209-232, 2006.

HYLENIUS, S.; ANDERSEN, A-M.N.; MELBY, M.; HVIID, T.V. Association between *HLA-G* genotype and risk of preeclampsia: a case-control study using family triads. **Molecular Human Reproduction**, v.10, n. 4, p. 237-246, 2004.

HUNT J.S.; PETROFF M.G.; McINTIRE R.H.; OBER C. *HLA-G* and immune tolerance in pregnancy. **The FASEB Journal**. v. 19, p. 681-693, 2005.

JANEWAY, C.A.; TRAVES, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Imunobiologia o sistema imune na saúde e na doença*. 4. ed. Porto alegre, Artmed, p. 557-559, 2002.

JANER M; GERAGHTY D.E. The human major histocompatibility complex: 42221 pb of genomic sequence, high-density sequence-tagged site map, evolution, and polymorphism for HLA Class I. **Genomics**, v.51, p35-44, 1998.

KWAK-KIM J.; PARK J.C.; AHN H.K.; KIM W.K.; GILMAN-SACHS A. Immunological modes of pregnancy loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, p. 611-623, 2010.

LAHIRI D.K.; NURNBERGER J.R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**. v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAMM, L.U.; OLASEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 5 and 6. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 40, p. 128, 1985.

LE BOUTEILLER, P.; LEGRAND-ABRAVANEL, F.; SOLIER, C. Soluble HLA-G1 at the materno-fetal interface - A review. **Placenta**, v. 17, p. 10-15, 2003.

LEMAOULT J.; ZAFARANLOO K.; LE DANFF C.; CAROSELLA E.D. *HLA-G* up-regulates ILT2, ILT3, ILT4 and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. **The FASEB Journal**, p. 1-23, 2005.

LILA, N.; AMREIN, C.; GUILLEMAIN, R.; CHEVALIER, P.; LATREMOUILLE, C.; FABIANI, J.N.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; CARPENTIER, A. Human leukocyte antigen-g expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Circulation**, v. 105, n. 16, p. 1949-1954, 2002.

MEDAWAR P.B. Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. **Symposium Society of Experience Biology**, v. 7, p. 320-328, 1953.

MICHELON T.; SILVEIRA J.G.; GRAUDENZ M.; NEUMANN J. Pregnancy Immunology. **Revista da AMRIGS**, v. 50, n. 2, p. 138-144, 2006.

MINCHEVA-NILSSON L.; STENQVIST A-C.; HADLUND M.; NAGAEVA O.; BARANOV V. The NKG2D/MIC system and exosomes in human pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 58(3), p.181-2, 2007.

OBER C.; ALDRICH C.L. *HLA-G* polymorphisms: neutral evolution or novel function? **Journal of Reproductive Immunology**, v. 36, p. 1-21, 1997.

OBER, C.; ALDRICH, C.; CHERVONEVA, I.; BILLSTRAND, C.; RAHIMOV, F.; GRAY, H.L.; HYSLOP, T. Variation in the *HLA-G* promoter region influences miscarriage rates. **The American Society of Human Genetics**, v.72, p. 1425-1435, 2003.

PAUL, P; ROUAS-FREISS, N; MOREAU, P; CABESTRE, FA; MENIER, C; DAHER-KHALIL, I; PANGAULT, C; ONNO, M; FAUCHET, R; MARTINEZ-LASO, J; MORALES, P; VILLENA, AA; GIACOMINI, P; NATALI, PG; FRUMENTO, G; FERRARA, GB; McMASTER, M; FISCHER, S; SCHUST, D; FERRONE, S; DAUSSET, J; GERAGHTY, D; CAROSELLA, ED. *HLA-G*, -E, -F Preworkshop: Tols and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression. **Human Immunology**, v.61, p 1177-1195, 2000.

PAUL, P.; CABESTRE, F.A.; IBRAHIM, E.C.; LEFEBVRE, S.; KHALIL-DAHER, I.; VAZEUX, G.; QUILES, R.N.M.; BERMOUND, F.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Identification of *HLA-G7* as a new splice variant of the *HLA-G* mRNA and expression of soluble *HLA-G5*, -*G6*, -*G7* transcript in human transfected cells. **Human Immunology**, v. 64, n.11, p. 1138-1149, 2000.

PAULI, S.A.; BERGA, S.L.; SHANG, W.; SESSION, D.R. Current status of the approach to assisted reproduction. **Pediatric Clinics of North America**, v. 56, p. 467-488, 2009.

PINHEIRO R.C.; LAMBERT J.; BÉNARD F.; MAUFFETTE F.; MIRON P. Effectiveness of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection for severe

male infertility. **Canadian Medical Association or its Licensors** v.161, n. 11, p. 1397-1401, 1999.

PIRRI, A.; CONTIERI, F.; BENVENUTTI, R.; BICALHO, M. A study of *HLA-G* polymorphism and linkage disequilibrium in transplant patients and their donors. **Transplant Immunology**, v. 20, p. 143-149, 2009.

REBMANN V., VAN DER VEN K., PABLER M., PFEIFFER K., KREBS D., GROSSE-WILDE H. Association of soluble *HLA-G* plasma levels with *HLA-G* alleles. **Tissue Antigens**, v. 57, p. 15-21, 2001. REBMANN, V.; SWITALA, M.; EUE, I.; SCHWAHN, E.; MERZENICH, M.; GROSSE-WILDE, H. Rapid evaluation of soluble *HLA-G* levels in supernatants of in vitro fertilized embryos. **Human Immunology**, v. 68, p. 251-258, 2007.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; FERRONE, S.; CAROSELLA, E.D. *HLA-G* proteins in câncer; do they provide tumor cells with an escape mechanism. **Cancer Research**, v. 65, p. 10139 – 10144, 2005.

ROUSSEV R.G.; COULAM C.B. *HLA-G* and its role in implantation (review). **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, p. 288-295, 2007.

SARGENT, I.L. Does 'soluble' *HLA-G* really exist? Another twist to the tale. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 10, p. 695-698, 2005.

SHARMA V.; ALLGAR V.; RAJKHOWA M. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility. **Fertility and Sterility** v.78 (1), p. 40-46, 2002.

SHER, G.; KESKINTEPE, L.; FISCH, J.D.; ACACIO, B.A.; AHLERING, P.; BATZOFIN, J.; GINSBURG, M. Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 5, p. 1410-1413, 2005.

SVEJGAARD, A.; JERSILD, C.; NIELSEN, L. S.; BODMER, W. F. HLA antigens and disease. Statistical and genetical considerations. **Tissue Antigens**; v.4, n. 2, p. 95-105, Review, 1974.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L.P. HLA and disease associations: detecting the strongest association - review. **Tissue Antigens**. v. 43, n. 1, p. 18-27, 1994.

TANNER, M. S.; SHARRARD, M. J.; RIGBY, A. S. Gene polymorphisms and the use of the bonferroni correction factor: when and when not to apply? **Arch Dis Child**, v. 76, p. 386, 1997.

VAN DER VEN, K.; SKRABLIN S.; ENGELS G.; KREBS D. *HLA-G* polymorphisms and allele frequencies in Caucasians. **Human Immunology**, v. 59, p. 302-312, 1998.

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. *HLA-G* polymorphisms and molecule function – question and more questions- a review. **Placenta**, v. 7, n. 4, p. 373-378, 2000.

VAN DEN ELSEN, P.J; GOBIN, S.J.P.; VAN DER STOEP, N.; DATEMA, G.; VIËTOR, H.E.; Transcriptional control of MHC genes in fetal trofoblast cells. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 129 – 145, 2001.

VINGANÓ, P.; CHIODO, I.; MANGIONI, S.; POMPEI, F. Maternal-conceptus cross talk - A review. **Placenta**, v. 00, p. 1-6, 2003.

WEGENER S.; SCHNURSTEIN K.; HANSCH S.; BOLZ M.; BRIESE V.; SUDIK R.; WEGENER R.; BUSECKE A.; MULLER H. Immunotherapy with paternal lymphocytes for recurrent miscarriages and unsuccessful in vitro fertilization treatment. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 33, p. 501-507, 2006

8. ANEXOS

ANEXO 1 – MATERIAL E MÉTODOS

ANEXO 2 – TABELAS INTEGRAIS DE RESULTADOS

ANEXO 3 – FICHAS DE AVERIGUAÇÃO

ANEXO 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANEXO 5 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO 1 – MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da Amostra

A amostra denominada paciente foi composta de 40 casais, não aparentados, com diagnóstico de Falha de Implantação Embrionária (FIE), que se caracteriza por ausência de gestação ou sua não evolução além de 12 – 20 semanas, após pelo menos duas transferências de embriões não-criopreservados (FIV/ICSI), independente da presença de algum fator identificado e controlado previamente (feminino e/ou masculino) (WEGENER *et al.*, 2006).

Todos os 40 casais tiveram recomendação de investigação imunológica, que consta de investigação de fatores aloimunes mais pesquisa de trombofilias auto-imunes e de origem genética. Também faz parte desta avaliação a realização de cariótipo do casal. Essa investigação é realizada no Centro de Imunologia da Reprodução (CIR), em Porto Alegre – RS, onde também foram coletadas, anteriormente à investigação imunológica, as amostras dos 40 casais.

Devido ao fato de que as amostras para este estudo foram coletadas anteriormente à investigação imunológica citada acima, a listagem de exames para a realização da mesma estão contidas no estudo somente a título de ilustração da investigação imunológica a qual são submetidas as pacientes de FIE.

A amostra denominada controle foi composta de 83 casais, não aparentados, com pelo menos duas gestações clínicas naturais, a termo, sem complicações, provenientes de Curitiba-PR.

O presente estudo faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da UFPR, sendo que o grupo paciente e controle assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo e para a coleta de amostras de sangue periférico. A realização da pesquisa e demais análises foram conduzidas no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Extração de DNA

Dez mililitros (10 mL) de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo, através de punção venosa, em tubos estéreis tipo *vacutainer* com EDTA, seguindo

normas de biossegurança. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos da qual foi extraído o DNA pela técnica de “*salting-out*”, que possibilita a obtenção de DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol (LAHIRI & NURNBERGER, 1991). Esse método desenvolve-se essencialmente em cinco etapas:

- Obtenção da camada de leucócitos por centrifugação do sangue total coletado com anticoagulante EDTA (Invitrogen).
- Lise de eritrócitos através do uso de tampão de lise de células vermelhas (RCLB 1X) pH 7,6.
- Quebra da membrana nuclear com SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)- da empresa Acros, a 20% e remoção de enzimas como DNases e RNases por meio de proteinase K e tampão da proteinase K (Invitrogen).
- Precipitação de proteínas com NaCl 6M (J. T. Backer).
- Precipitação do DNA com etanol absoluto (Merck).

Determinação da Concentração de DNA

Após extração, as amostras de DNA foram quantificadas pela leitura da densidade ótica (D.O.), utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Para a tipificação do gene *HLA-G* foi utilizada uma concentração de DNA de 50ng/μl, sendo a diluição das amostras realizada utilizando-se água ultrapura.

Tipagem do gene HLA-G pela técnica de sequenciamento automatizado

A reação de sequenciamento requer a etapa prévia de amplificação dos exons 2, 3 e 4 do gene *HLA-G*. As sequências de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação e sequenciamento dos fragmentos alvo foram desenhadas para estudos anteriores, no próprio laboratório, com a ajuda do programa DNASTar (<http://www.dnastar.com>). Para conferir a especificidade das mesmas foi utilizado o

programa PrimerBlast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd).

Amplificação dos exons 2, 3 e 4

A partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para os exons 2, 3 e 4 do gene HLA-G (Tabela 4) foi feita a amplificação por PCR no aparelho termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®), obtendo-se amplicons de 421, 547 e 364 pb, respectivamente. As tabelas 5 e 6 sintetizam o protocolo utilizado.

TABELA 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do loco *HLA-G*

Iniciadores para amplificação dos exons 2, 3 e 4	
EXON 2	G25S': GGGTCGGGCGGGTCTCAA G23S': TCCGTGGGGCATGGAGGT
EXON 3	G35S': CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG G33S': CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA
EXON 4	G45S': CCATGAGAGATGCAAAGTGCT G43S': TGCTTTCCCTAACAGACATGAT

TABELA 5. Reação de amplificação dos exons 2, 3 e 4 de *HLA-G*

Reagentes	Volume/Quantidade
DNA molde (50ng/μl)	1,2μl
Tampão Taq 10X	5,0μl
MgCl ₂ (50mM)	1,5μl
dNTP (1,8mM)	6μl
Primer 5' (100pMoles)	0,1μl
Primer 3' (100pMoles)	0,1μl
Enzima <i>Taq Platinum</i> Invitrogen	0,45μl
Água ultrapura (18,2MΩcm)	q.s.p. 50μl

TABELA 6. Condições de amplificação dos exon 2, 3 e 4 do gene *HLA-G*

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo (desnaturação inicial)	94°C	5 minutos
35 ciclos (desnaturação, anelamento, alongamento)	94°C	30 segundos
	66°C (exon 2)/	30 segundos
	70°C (exon 3)/	
	62°C (exon 4)	
	72°C	2 minutos
1 ciclo (alongamento final)	72°C	5 minutos

Controle da amplificação

Para confirmação da presença de produto de amplificação específico foram realizadas eletroforeses em gel de agarose 1% durante 15 minutos, 68 Volts, 125 mAmperes (Figura 5).

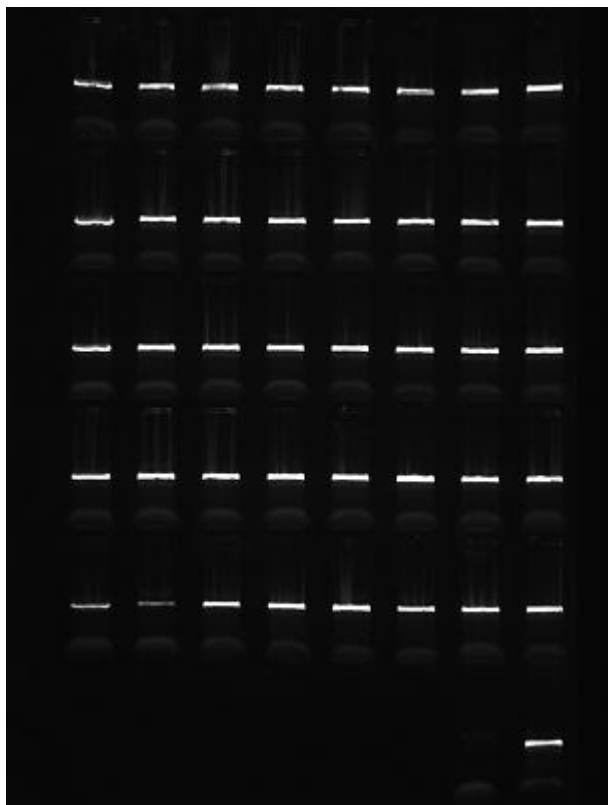


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1%. Exemplo da verificação da amplificação do exon 4 de *HLA-G* em gel de agarose 1%, possuindo 364 pb, nas condições de 15 minutos, 68 Volts e 125 mAmperes.

Purificação do produto amplificado

Os produtos de PCR obtidos foram purificados através do método enzimático utilizando Exonuclease I (EXO I) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP; *do inglês: Shrimp Alkaline Phosphatase*) da empresa USB Corporation[®], com o objetivo de eliminar oligonucleotídeos iniciadores não hibridizados, desoxi-nucleotídeos (dNTPs) não utilizados e resíduos de DNA de fita simples que possam ter sobrado ou se originado na reação de amplificação anterior, dado que a presença destes elementos residuais comprometem a análise do sequenciamento. As concentrações dos reagentes utilizados encontram-se na Tabela 7 e as condições de ciclagem estão presentes na Tabela 8. O termociclador utilizado para esta etapa foi o GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems[®]).

TABELA 7. Reagentes utilizados na etapa de purificação

Reagentes	Volume/Quantidade
Produto de PCR	6,9µl
EXO I (10 U/ µl)	1,0µl
SAP (1 U/ µl).....	2,0µl
Tampão de reação SAP 10X	2,0µl

TABELA 8. Condições de ciclagem utilizadas na etapa de purificação

Nº ciclos	Temperatura	Tempo
1	37°C	60 minutos
1	80°C	15 minutos

Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada através do Kit *ABI PRISM®* BigDye® (Life Technologies™, Carlsbad, USA) e o termociclador utilizado para essa reação foi o Veriti 96 Well Thermal Cycler (Life Technologies™, Carlsbad, USA). O protocolo de sequenciamento está descrito na Tabela 9 e as condições de ciclagem para o gene *HLA-G* são mostradas na Tabela 10. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados em cada reação de sequenciamento do gene *HLA-G* são mostrados na Tabela 11.

TABELA 9. Reagentes utilizados na reação de sequenciamento

Reagentes	Volume/Quantidade
Produto de PCR purificado	10µl
Oligonucleotídeo iniciador (1,6 pM)	1,6µl
Big Dye.....	1,0µl
Tampão 10X (save)	0,5µl

TABELA 10. Condições de ciclagem para reação de sequenciamento do gene *HLA-G*

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	1 minutos
	96°C	15 segundos
35 ciclos	54°C	15 segundos
	60°C	2 minutos

TABELA 11. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de sequenciamento

Iniciadores para amplificação dos exons 2, 3 e 4	
EXON 2	G25S': GGGTCGGGCGGGTCTCAA G23S': TCCGTGGGGCATGGAGGT
EXON 3	G35S': CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG G33S': CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA
EXON 4	G45S': CCATGAGAGATGCAAAGTGCT G43S': TGCTTTCCCTAACAGACATGAT

Precipitação do DNA sequenciado

Solução salina NaOAc/EDTA da USB Corporation® foi utilizada para a precipitação, onde foram realizados sucessivos passos de centrifugação em diferentes concentrações de etanol. O produto precipitado foi ressuspendido em 12µl de formamida Hi-Di e desnaturado a 95 °C por 2 minutos no termociclador TC-512 da empresa Techne®, seguido por choque térmico (-80 °C) durante 40 segundos.

Eletroforese Capilar

O produto da reação de sequenciamento precipitado e ressuspendido em formamida foi submetido à corrida eletroforética em capilar de 36 cm, utilizando polímero POP 7 (Life Technologies™, Carlsbad, USA) e sequenciador automático ABI Prism 3130 da empresa Applied Biosystems.

Tipagem de *HLA-G*

Os dados de sequenciamento obtidos foram visualizados através do programa *Sequencing Analysis v.5.2* (Applied Biosystems) e analisados com o auxílio dos programas *SeqScape v.2.7* (Applied Biosystems) e do programa *FinchTv* da empresa Geospiza® (Figura 6). A identificação alélica ocorreu por pareamento com as sequências genômicas de alelos oficiais (Sistema de Informação Internacional de Imunogenética – IMGT) e cada SNPs detectado foi individualmente anotado. Após esta etapa os dados foram analisados estatisticamente.

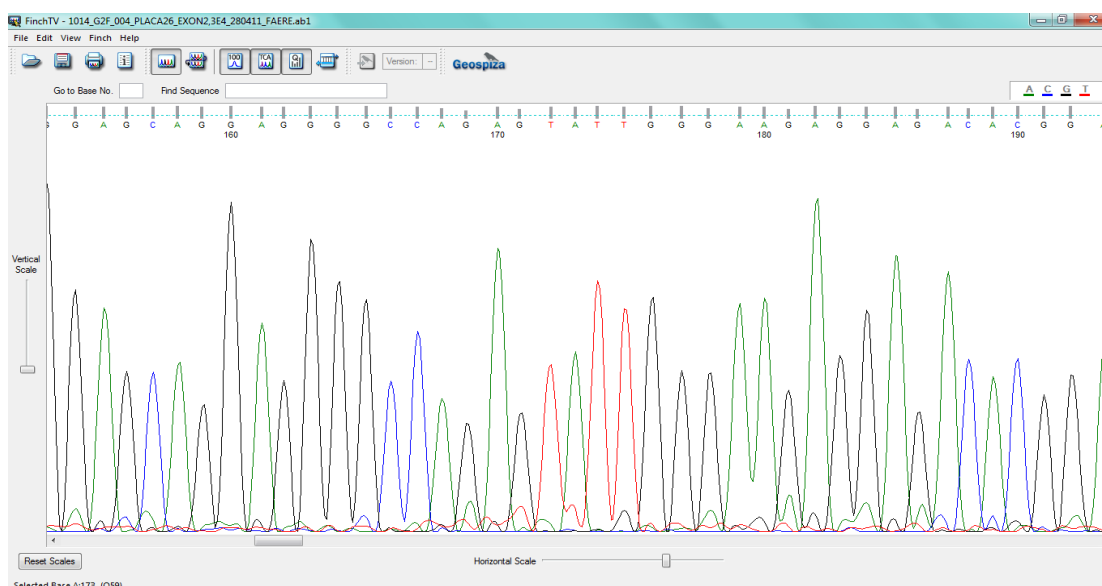


Figura 6. Exemplo de eletroferograma analisado

Quantificação de sHLA-G

Foi realizada a coleta de sangue periférico de 101 mulheres (41 pacientes e 60 controles) através de punção venosa, em tubos estéreis de sistema a vácuo, sem a presença de anticoagulante, para obtenção de amostras de soro.

A quantificação de sHLA-G foi realizada através do kit sHLA-G ELISA (BioVendor, EXBIO Praha, A.S.) de acordo com as recomendações do fabricante. O kit quantifica o nível sérico de sHLA-G1 (HLA-G5) das amostras analisadas.

A absorção do produto resultante foi medida espectrofotometricamente em 450 nm. A absorbância é proporcional à concentração de sHLA-G. A curva padrão de calibração foi construída em escala logarítma, plotando o valor médio de absorbância dos calibradores contra a concentração dos mesmos. A concentração de cada amostra foi determinada através da curva de calibração. O leitor das placas de ELISA utilizado foi o ELX-800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA). O resultado da concentração de sHLA-G de cada amostra foi representado em U/ml.

Análise estatística

Análises comparativas de frequências gênicas

Os resultados da tipagem de cada um dos indivíduos, obtidos por contagem direta, foram inseridos no programa estatístico ARLEQUIN v.3.0 (EXCOFFIER & LAVAL, 2005) com a finalidade de avaliar a condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg (utilizando o método de GUO & THOMPSON, 1992). As frequências alélicas foram obtidas através da fórmula:

$$F_{al} = n/2N$$

Onde:

F_{al} : frequência alélica (ou de determinado grupo alélico)

n : frequência absoluta de um alelo ou grupo alélico na amostra

N : número de indivíduos na amostra. O N é multiplicado por 2, pois cada indivíduo é portador de duas cópias de cada gene.

Uma vez obtidas as frequências dos genes estudados, no grupo de casais com falha de implantação e no grupo de casais controle, foram realizadas as análises comparativas ou de associação entre as diferentes amostras segundo diversas abordagens (geral e estratificação por sexo), para avaliar a existência de associação entre a distribuição dos genes e FIE.

Todas as comparações foram realizadas através do uso do Teste Exato de Fisher, ou Qui-quadrado (dependendo do tamanho da amostra que foi analisada para cada teste) em tabelas de contingência 2x2, mediante o uso do programa BioEstat – Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas (AYRES *et al.*, 2005).

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (indicando associação) nos casos em que $p \leq 0,05$. Como fator de correção os valores de p foram multiplicados pelo número de alelos ou de genótipos testados (p_c) (TANNER MS *et al.*, 1997). Nos casos em que a diferença entre as frequências gênicas de pacientes e controles apresentaram significância estatística, foi calculado “Odds Ratio” (“OR” ou razão de probabilidades), com intervalo de confiança de 95%, através da fórmula $OR = (A \times D) / (B \times C)$ (WOLF, 1955), sendo os valores A, B, C e D obtidos da tabela:

	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado (alelo ou genótipo)	A	B
Negativo para o fator pesquisado (alelo ou genótipo)	C	D

O valor desta OR, em análises de associação, é tomado como sinônimo do valor de risco relativo (RR), que exprime quantas vezes a característica é mais frequente entre os portadores de um determinado fator comparando com indivíduos sem o fator (SVEJGAARD *et al.*, 1974). foram consideradas significativas as associações com $p \leq 0,05$ e como próximas ao limiar de significância (tendência) os valores de $p > 0,05$ e $\leq 0,10$.

Nos casos em que o valor de alguma das células (A, B, C ou D) foi 0, foi realizada a correção de Haldane, que consiste de acrescentar o valor de 0,5 a todas as células da tabela de contingência com o objetivo de prevenir erro de cálculo do OR quando da divisão de um valor por zero. Sua fórmula é: $RR = [(A+1/2).(D+1/2)/(B+1/2).(C+1/2)]$ (SVEJGAARD & RYDER, 1994).

Valores de OR acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver a afecção; valores abaixo de 1, a uma menor probabilidade.

Análises de associação dos níveis séricos de sHLA-G

A análise comparativa entre os níveis séricos de sHLA-G nos grupos paciente e controle, com o objetivo de avaliar possíveis diferenças nos níveis séricos de sHLA-G entre os dois grupos, foi realizado através do Teste Mann-Whitney, por se tratar de uma variável quantitativa sem distribuição normal.

Para avaliar a possível associação entre os alelos do *HLA-G* e os respectivos níveis séricos, os grupos paciente e controle foram unidos, pelo fato de não existir diferença significativa entre eles, podendo assim serem considerados como um único grupo. Para essa análise foi realizado o Teste Mann-Whitney, visando verificar a existência de diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as medianas dos níveis séricos de sHLA-G e os diferentes alelos deste gene encontrados nesta amostra.

Como fator de correção os valores de p foram multiplicados pelo número de alelos testados (p_c) (TANNER MS *et al.*, 1997). O programa estatístico utilizado para essas análises foi o BioEstat – Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas (CURI, 1998).

ANEXO 2 - TABELAS INTEGRAIS DE RESULTADOS

Frequências do gene HLA-G

TABELA 12. Comparação das frequências alélicas do gene *HLA-G*

Alelos	Pacientes (n=162)		Controles (n=334)		<i>p-value/ p_c</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*01:01:01</i>	63	38,89	142	42,51	0,5017
<i>HLA-G*01:01:02</i>	35	21,60	85	25,45	0,4089
<i>HLA-G*01:01:03</i>	03	1,85	19	5,69	0,0865
<i>HLA-G*01:01:06</i>	01	0,06	00	0,00	0,7113
<i>HLA-G*01:01:07</i>	00	0,00	01	0,03	0,7113
<i>HLA-G*01:01:08</i>	12	7,40	31	9,28	0,5993
<i>HLA-G*01:01:12</i>	01	0,06	00	0,00	0,7113
<i>HLA-G*01:01:14</i>	01	0,06	00	0,00	0,7113
<i>HLA-G*01:01:20</i>	01	0,06	00	0,00	0,7113
<i>HLA-G*01:03:01</i>	18	11,11	11	3,29	0,0011/0,0165
<i>HLA-G*01:04:01</i>	18	11,11	30	8,98	0,5555
<i>HLA-G*01:04:03</i>	01	0,06	01	0,03	0,5470
<i>HLA-G*01:04:04</i>	02	1,23	01	0,03	0,2644
<i>HLA-G*01:06</i>	05	3,08	09	2,70	0,7790
<i>HLA-G*01:05N</i>	03	1,85	02	0,06	0,3361

TABELA 13. Comparação das frequências alélicas do gene *HLA-G* entre as mulheres dos grupos paciente e controle

Alelos	Mulheres Pacientes (n=82)		Mulheres Controles(n=166)		<i>p-value/ p_c</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*01:01:01</i>	30	36,58	81	48,80	0,0923
<i>HLA-G*01:01:02</i>	17	20,73	40	24,10	0,6657
<i>HLA-G*01:01:03</i>	02	2,44	12	7,23	0,1523
<i>HLA-G*01:01:06</i>	01	1,22	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:01:08</i>	06	7,32	12	7,23	0,8142
<i>HLA-G*01:01:14</i>	01	1,22	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:01:20</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:03:01</i>	08	9,75	04	2,41	0,0226/0,2712
<i>HLA-G*01:04:01</i>	12	14,63	10	6,02	0,0448/0,5376
<i>HLA-G*01:04:04</i>	01	1,22	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:06</i>	02	2,44	05	3,01	1,0000
<i>HLA-G*01:05N</i>	02	2,44	01	0,06	0,2548

TABELA 14. Comparação das frequências alélicas do gene *HLA-G* entre os homens dos grupos paciente e controle

Alelos	Homens Pacientes (n=80)		Homens Controles(n=166)		<i>p-value/ p_c</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*01:01:01</i>	33	41,25	61	36,31	0,5421
<i>HLA-G*01:01:02</i>	18	22,50	19	11,31	0,5695
<i>HLA-G*01:01:03</i>	01	1,25	07	4,17	0,4428
<i>HLA-G*01:01:07</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:01:08</i>	06	7,50	19	11,31	0,8181
<i>HLA-G*01:01:12</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:03:01</i>	10	12,50	07	4,20	0,0380 /0,3696
<i>HLA-G*01:04:01</i>	06	7,50	20	11,90	0,4027
<i>HLA-G*01:04:03</i>	01	1,25	01	0,06	0,5420
<i>HLA-G*01:04:04</i>	01	1,25	01	0,06	0,5420
<i>HLA-G*01:06</i>	03	3,75	04	2,38	0,6843
<i>HLA-G*01:05N</i>	01	1,25	01	0,06	0,5420

TABELA 15. Comparação das frequências genotípicas do gene *HLA-G*

Alelos	Pacientes (n=81)		Controles (n=167)		<i>p-value/ p_c</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:01</i>	17	20,98	35	20,96	0,8721
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:02</i>	10	12,34	28	16,76	0,4725
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:03</i>	00	0,00	05	2,99	0,1762
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:07</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:08</i>	00	0,00	16	9,58	0,0092 /0,2944
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:12</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:01:01*01:03:01</i>	08	9,87	02	1,19	0,0063 /0,2016
<i>HLA-G*01:01:01*01:04:01</i>	07	8,54	13	7,78	0,9872
<i>HLA-G*01:01:01*01:04:03</i>	01	1,23	00	0,00	0,3266
<i>HLA-G*01:01:01*01:04:04</i>	02	2,47	01	0,06	0,2494
<i>HLA-G*01:01:01*01:06</i>	02	2,47	05	2,99	1,0000
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:02</i>	03	3,70	13	7,78	0,3415
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:03</i>	00	0,00	06	3,59	0,1815
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:06</i>	01	1,23	00	0,00	0,3266
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:08</i>	07	8,64	06	3,59	0,1272
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:20</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:01:02*01:03:01</i>	04	4,94	04	2,39	0,4439
<i>HLA-G*01:01:02*01:04:01</i>	03	3,70	09	5,39	0,7558
<i>HLA-G*01:01:02*01:04:03</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:01:02*01:05N</i>	03	3,70	02	1,19	0,3337
<i>HLA-G*01:01:02*01:06</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:01:03*01:01:03</i>	00	0,00	02	1,19	1,0000
<i>HLA-G*01:01:03*01:03:01</i>	02	2,47	01	0,06	0,2494
<i>HLA-G*01:01:03*01:04:01</i>	01	1,23	05	2,99	0,6669
<i>HLA-G*01:01:08*01:01:08</i>	00	0,00	03	1,79	0,5530
<i>HLA-G*01:01:08*01:06</i>	00	0,00	02	1,19	1,0000
<i>HLA-G*01:01:14*01:03:01</i>	01	1,23	00	0,00	0,3266
<i>HLA-G*01:03:01*01:03:01</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:03:01*01:04:01</i>	01	1,23	02	1,19	1,0000
<i>HLA-G*01:03:01*01:06</i>	02	2,47	00	0,00	0,1058
<i>HLA-G*01:04:01*01:01:08</i>	05	6,17	01	0,06	0,0151 /0,4832
<i>HLA-G*01:04:01*01:06</i>	01	1,23	00	0,00	0,3266

TABELA 16. Comparação das frequências genotípicas do gene *HLA-G* entre as mulheres dos grupos paciente e controle

Alelos	Mulheres Pacientes (n=41)		Mulheres Controles (n=83)		<i>p</i> -value/ <i>p_c</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:01</i>	08	19,51	22	26,50	0.5051
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:02</i>	07	17,07	16	19,57	0,9589
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:03</i>	00	0,00	05	6,02	0,1696
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:08</i>	00	0,00	05	6,02	0,1696
<i>HLA-G*01:01:01*01:03:01</i>	03	7,31	01	1,20	0,1051
<i>HLA-G*01:01:01*01:04:01</i>	02	4,88	04	4,82	1,0000
<i>HLA-G*01:01:01*01:04:04</i>	01	2,44	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:01:01*01:06</i>	01	2,44	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:02</i>	00	0,00	05	6,02	0,1696
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:03</i>	00	0,00	03	3,61	0,5501
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:06</i>	01	2,44	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:08</i>	02	4,88	04	4,82	1,0000
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:20</i>	00	0,00	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:01:02*01:03:01</i>	01	1,23	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:01:02*01:04:01</i>	04	9,75	04	4,82	0,4377
<i>HLA-G*01:01:02*0105N</i>	02	4,88	01	1,20	0,2538
<i>HLA-G*01:01:03*01:01:03</i>	00	0,00	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:01:03*01:03:01</i>	01	1,23	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:01:03*01:04:01</i>	01	1,23	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:01:08*01:06</i>	00	0,00	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:01:14*01:03:01</i>	01	1,23	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:03:01*01:04:01</i>	01	1,23	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:03:01*01:06</i>	01	1,23	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:04:01*01:01:08</i>	04	9,75	00	0,00	0,0108/0,2592

TABELA 17. Comparação das frequências genotípicas do gene *HLA-G* entre os homens dos grupos paciente e controle

Alelos	Homens Pacientes (n=40)		Homens Controles (n=84)		<i>p</i> -value/ <i>p_c</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:01</i>	09	22,50	13	15,47	0,4804
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:02</i>	03	7,50	12	14,28	0,9589
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:07</i>	00	0,00	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:08</i>	00	0,00	09	10,71	0,0310 /0,8370
<i>HLA-G*01:01:01*01:01:12</i>	00	0,00	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:01:01*01:03:01</i>	05	12,50	01	1,20	0,0132 /0,3564
<i>HLA-G*01:01:01*01:04:01</i>	04	4,00	09	10,71	1,0000
<i>HLA-G*01:01:01*01:04:03</i>	01	2,50	00	0,00	0,3226
<i>HLA-G*01:01:01*01:04:04</i>	02	2,47	01	0,06	0,2494
<i>HLA-G*01:01:01*01:06</i>	01	2,50	01	0,06	0,5429
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:02</i>	03	7,50	08	9,50	1,0000
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:03</i>	00	0,00	03	3,57	0,5504
<i>HLA-G*01:01:02*01:01:08</i>	05	12,50	02	2,38	0,0350 /0,9450
<i>HLA-G*01:01:02*01:03:01</i>	03	7,50	03	3,57	0,3864
<i>HLA-G*01:01:02*01:04:01</i>	00	0,00	05	5,95	0,1741
<i>HLA-G*01:01:02*01:04:03</i>	00	0,00	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:01:02*01:05N</i>	01	2,50	01	1,20	0,5429
<i>HLA-G*01:01:02*01:06</i>	00	0,00	02	2,38	0,5594
<i>HLA-G*01:01:03*01:03:01</i>	01	2,50	00	0,00	0,3226
<i>HLA-G*01:01:03*01:04:01</i>	00	0,00	04	4,76	0,3039
<i>HLA-G*01:01:08*01:01:08</i>	00	0,00	03	3,57	0,5504
<i>HLA-G*01:01:08*01:06</i>	00	0,00	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:01:14*01:03:01</i>	00	0,00	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:03:01*01:04:01</i>	00	0,00	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:03:01*01:06</i>	01	2,50	00	0,00	0,3226
<i>HLA-G*01:04:01*01:01:08</i>	01	2,50	01	1,20	0,5429
<i>HLA-G*01:04:01*01:06</i>	01	2,50	00	0,00	0,3226

TABELA 18. Comparação dos portadores de alelos do gene *HLA-G*

Alelos	Pacientes (n=81)		Controles (n=167)		<i>p-value/ p_c</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*01:01:01</i>	46	56,79	107	64,07	0,3336
<i>HLA-G*01:01:02</i>	32	39,50	72	43,11	0,6871
<i>HLA-G*01:01:03</i>	03	3,70	18	10,77	0,1023
<i>HLA-G*01:01:06</i>	01	1,23	00	0,00	0,3266
<i>HLA-G*01:01:07</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:01:08</i>	12	14,81	28	16,76	0,8259
<i>HLA-G*01:01:12</i>	00	0,00	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:01:14</i>	01	1,23	00	0,00	0,3266
<i>HLA-G*01:01:20</i>	01	0,06	00	0,00	0,7113
<i>HLA-G*01:03:01</i>	18	22,22	10	5,98	0,0004/0,0060
<i>HLA-G*01:04:01</i>	18	22,22	30	17,96	0,7206
<i>HLA-G*01:04:03</i>	01	1,23	01	0,06	1,0000
<i>HLA-G*01:04:04</i>	02	2,46	01	0,06	0,2494
<i>HLA-G*01:06</i>	05	6,17	08	4,79	0,7626
<i>HLA-G*01:05N</i>	03	3,70	02	1,19	0,3337

TABELA 19. Comparação dos portadores de alelos do gene *HLA-G* entre as mulheres dos grupos paciente e controle

Alelos	Mulheres Pacientes (n=41)		Mulheres Controles(n=83)		<i>p-value/ p_c</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*01:01:01</i>	22	53,65	59	71,08	0,0859
<i>HLA-G*01:01:02</i>	17	41,46	35	42,16	0,9056
<i>HLA-G*01:01:03</i>	02	4,87	11	13,25	0,2169
<i>HLA-G*01:01:06</i>	01	2,43	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:01:08</i>	06	14,63	12	14,45	0,8067
<i>HLA-G*01:01:14</i>	01	2,43	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:01:20</i>	00	0,00	01	1,20	1,0000
<i>HLA-G*01:03:01</i>	08	19,51	04	4,81	0,0194/0,2328
<i>HLA-G*01:04:01</i>	12	29,26	10	12,04	0,0347/0,4164
<i>HLA-G*01:04:04</i>	01	2,43	00	0,00	0,3306
<i>HLA-G*01:06</i>	02	4,87	05	6,02	1,0000
<i>HLA-G*01:05N</i>	02	4,87	01	1,20	0,2538

TABELA 20. Comparação dos portadores de alelos do gene HLA-G entre os homens dos grupos paciente e controle

Alelos	Homens Pacientes (n=40)		Homens Controles(n=84)		<i>p-value/ p_c</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*01:01:01</i>	24	60,00	48	57,14	0,9150
<i>HLA-G*01:01:02</i>	15	37,50	37	44,04	0,6199
<i>HLA-G*01:01:03</i>	01	2,50	07	8,33	0,2748
<i>HLA-G*01:01:07</i>	00	0,00	01	1,19	1,0000
<i>HLA-G*01:01:08</i>	06	15,00	16	19,04	0,7641
<i>HLA-G*01:01:12</i>	00	0,00	01	1,19	1,0000
<i>HLA-G*01:03:01</i>	10	25,00	06	7,14	0,0091
<i>HLA-G*01:04:01</i>	06	15,00	20	23,80	0,3732
<i>HLA-G*01:04:03</i>	01	2,50	01	1,19	1,0000
<i>HLA-G*01:04:04</i>	01	2,50	01	1,19	1,0000
<i>HLA-G*01:06</i>	03	7,50	04	4,76	0,6799
<i>HLA-G*01:05N</i>	01	2,50	01	1,19	1,0000

Quantificação de sHLA-G

TABELA 21. Comparação entre as concentrações de sHLA-G entre pacientes e controles

<u>[] sHLA-G Pacientes (n=21)</u>	<u>[] sHLA-G Controles (n=18)</u>	<u>Mann-Whitney Test (p-value)</u>
U/ml	U/ml	
3,91	75,85	0,1429
4,53	6,84	
19,92	28,95	
27,60	5,76	
9,49	7,41	
82,29	58,85	
32,89	56,64	
138,53	20,26	
29,14	164,44	
24,26	13,51	
23,86	38,33	
22,67	56,85	
72,96	4,51	
73,46	192,24	
6,63	68,02	
8,12	25,16	
15,04	52,14	
20,79	302,84	
5,40		
10,46		
22,41		

TABELA 22. Associação entre alelos do gene *HLA-G* e níveis de sHLA-G

<u>Alelos <i>HLA-G</i></u>	<u>n</u>	<u>sHLA-G (U/ml)</u>	<u>Mann-Whitney Test</u>	<u>p_c value</u>
		<u>Mediana</u>	<u>(p-value)</u>	
<i>HLA-G*01:01:01</i>	28	27,06; P ₂₅ =12.75; P ₇₅ = 61.15	0,6159	1,0000
<i>HLA-G*01:01:02</i>	15	23,86; P ₂₅ =6.76; P ₇₅ = 47.59	0,3079	1,0000
<i>HLA-G*01:04:01</i>	10	23,13; P ₂₅ =12.09; P ₇₅ = 73.33	0,9502	1,0000
<i>HLA-G*01:03:01</i>	05	32,89; P ₂₅ =22.66; P ₇₅ = 138.52	0,3575	1,0000

ANEXO 3 - FICHAS DE AVERIGUAÇÃO

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH)

Departamento de Genética – UFPR

PROJETO: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL PACIENTE - FIE

1 – Identificação do Casal

1 - Nome da mulher:

2 - Data de Nasc:.

Idade:

G. Étnico:

3 – Profissão:

G. Sanguíneo:

4 – Fumante () Sim Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)
() Não

5 – Nome do Marido:

6 – Data de Nasc:.

Idade:

G. Étnico:

7 – Profissão:

G. Sanguíneo:

8 – Fumante () Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)
() Não

9 – Endereço:

Nº:

Apartamento

Bairro

Cidade

Estado

CEP

Tel. Res.

Tel. Com.

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união _____ Idade da mulher ao se casar _____

2 – Consanguinidade: () S () N Grau de parentesco: _____

3 – Relato de casos de infertilidade ou dificuldade de engravidar na família

() Sim () Não

Se sim: () família da mulher () família do homem

4 – Nº total de tratamentos de reprodução anteriores: _____ Abortos _____

6 – Causa da infertilidade _____

7 – Medicação para indução da ovulação _____

5 – Número de óvulos obtidos _____

5 – Número de embriões transferidos _____

Qualidade do embrião _____

8 – Número de embriões vivos _____

9 – Avaliação no 3º dia após a estimulação

Volume ovariano _____

Nº de folículo antral _____

Nível de FSH (Folículo estimulante) _____

Nível de Estradiol _____

3 – Antecedentes Maternos

1 – Concebe facilmente () Sim () Não

2 – Usa método anticoncepcional? () Sim () Não

Há quanto tempo? _____

Qual? _____

3 – Idade da primeira menstruação: _____

4 – Enfermidade aguda? () Sim () Não

Especifique: _____

5 – Enfermidade crônica? () Sim () Não

Qual? _____

6 – Doença auto-imune? () Sim () Não

Qual? _____

7 – Recebeu transfusão sanguínea? () Sim () Não

Quando? _____

5 – Outros fatores

1 – Fatores femininos

a) Problemas ovulatórios com Clamídias () Sim () Não

b) Cervix incompetente () Sim () Não

c) Síndrome de Asherman () Sim () Não

d) Efeito da fase luteal () Sim () Não

e) Problemas anatômicos () Sim () Não

Quais? _____

2 – Fatores masculinos

a) Prostatite () Sim () Não

3 – Fatores do Casal

a) Infecção por Micoplasma () Sim () N

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH)

Departamento de Genética – UFPR

CONTROLES: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL CONTROLE

1 – Identificação do Casal

1 - Nome da mulher:

2-Fumante () Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)
() Não

3 - Data de Nasc: Idade: G. Étnico:

4 – Profissão: G. Sanguíneo:

5 – Nome do cônjuge:

6- Fumante () Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)
() Não

7 – Data de Nasc.: Idade: G. Étnico:

8 – Profissão: G. Sanguíneo:

7 – Endereço: Nº: Compl:

Bairro: Cidade: Estado:

CEP: Tel. Res.: Tel. Com.:

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união: Consangüinidade: ()S ()N

2 – Idade da mulher ao se casar : Grau de parentesco:

3 – Nº total de concepções: Abortos: Natimortos: N. vivos:

4 – Concepções: 1^a 2^a 3^a 4^a 5^a 6^a

5 – Outras uniões ou casamentos: Consangüinidade: ()S ()N

6 – Data da união: Nº de concepções:

7 – Idade da mulher ao se casar:

8 – Outras uniões ou casamentos: Consangüinidade: ()S ()N

9 – Data da união: Nº de concepções:

10 – Idade da mulher ao se casar:

3 – Antecedentes Maternos

1 – Idade ou data da última gravidez:

2 – Concede facilmente? () Sim () Não

3 – Usa método anticoncepcional? Há quanto tempo? Qual?

4 – Idade da primeira menstruação: _____

5 – Enfermidade aguda? () Sim () Não

Especifique: _____

6 – Enfermidade crônica? () Sim () Não

Especifique: _____

7 – Doença auto-imune? () Sim () Não

Especifique: _____

8 – Recebeu transfusão sanguínea? () Sim () Não

Quando? _____

9 – Data da última gestação: _____

ANEXO 4 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você está sendo convidado a participar como: () PACIENTE () CONTROLE de um estudo intitulado “DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALOENXERTO E ENXERTO SEMI-ALOGÊNICO”. É através das pesquisas, inclusive básicas, que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância;
- b) O objetivo desta pesquisa é buscar subsídios que possam ajudar a esclarecer fenômenos relacionados ao sucesso da implantação do embrião no útero materno. Essas informações serão também importantes para o entendimento de alterações que ocorrem no período gestacional tais como, abortos recorrentes de causas desconhecidas, pré eclampsia e inclusive auxiliar no entendimento dos mecanismos que contribuem para aceitação/rejeição de órgãos transplantados. A participação de controles neste caso é de fundamental importância, pois é através das comparações entre dados clínicos entre amostras caracterizadas como Paciente e Controle é que se pode concluir sobre a influência do componente genético na condição clínica sob estudo.
- c) Caso você participe da pesquisa, será necessário que você forneça uma amostra de sangue (10ml);
- d) O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam danos a pacientes ou controles;
- e) Não há riscos para você;
- f) Para tanto você deverá coletar sangue na clínica onde realiza o tratamento;
- g) A pesquisadora responsável pelo projeto, Profa. Maria da Graça Bicalho – fone: 3361-1729 poderá ser contatada no LIGH;
- h) Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa;
- i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa;
- j) As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório, publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida;
- l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são de responsabilidade dos pacientes ou controles;
- m) Pela sua participação na pesquisa você não receberá qualquer valor em dinheiro;
- n) Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código;

Eu, li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convocado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado a coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa. Eu concordo, voluntariamente, em participar desta pesquisa.

Ass. Paciente/Controle _____

Ass. Pesquisador _____

Data ____/____/____

ANEXO 5 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Curitiba, 02 de agosto de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a)(s)
MARIA DA GRAÇA BICALHO DE LACERDA
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de pesquisa **"DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELEVANTES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALO-ENXERTO"**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP-HC nº 037ext.019/2001-07

O referido projeto foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 31 de julho de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente

Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Serres Humanos do Hospital de Clinicas – UFPR